

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Luize Néli Nunes Garcia**

**Avaliação da resposta imune em galinhas contra *Brucella abortus* por meio da produção de IgY e quantificação da expressão de genes de virulência regulados pelo sistema de dois componentes BvrR/BvrS**

Campos dos Goytacazes  
Fevereiro, 2014

**LUIZE NÉLI NUNES GARCIA**

**Avaliação da resposta imune em galinhas contra *Brucella abortus* por meio da produção de IgY e quantificação da expressão de genes de virulência regulados pelo sistema de dois componentes BvrR/BvrS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal, linha de pesquisa Enfermidades Infectocontagiosas e Parasitárias dos Animais.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Manhães Folly  
Coorientadores: Prof. Dr. Olney Vieira da Motta  
Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro

Campos dos Goytacazes  
Fevereiro, 2014

LUIZE NÉLI NUNES GARCIA

**Avaliação da resposta imune em galinhas contra *Brucella abortus* por meio da produção de IgY e quantificação da expressão de genes de virulência regulados pelo sistema de dois componentes BvrR/BvrS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração Sanidade Animal, e linha de pesquisa Enfermidades Infectocontagiosas e Parasitárias dos Animais.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Valmir Laurentino-Silva (D.Sc., Biologia Animal) - FIOCRUZ

---

Prof. Enrique Medina-Acosta (D.Sc., Parasitologia Médica e Molecular) – UENF

---

Prof. Olney Vieira da Motta (D.Sc., Biociências e Bacteriologia) – UENF  
(Coorientador)

---

Prof. Márcio Manhães Folly (D.Sc., Bacteriologia) - UENF  
(Orientador)

Aos meus amados pais, Josely Garcia e Lenize Nunes Garcia;

Ao meu querido irmão, Gabriel Nunes Garcia;

A todos os meus familiares, em especial aos meus tios, Joselma Garcia da Fonseca e Carlos Alberto da Fonseca;

Ao meu companheiro, Farlen José Bebber Miranda;

Com todo o carinho.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família e, em especial, aos meus pais, Josely Garcia e Lenize Nunes Garcia, que sempre colocaram a educação dos filhos em primeiro lugar;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à Universidad Nacional de Costa Rica, onde foram realizados todos os procedimentos contidos no presente trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, que me acolheu em seu quadro, dando-me a oportunidade do aperfeiçoamento;

Ao prof. Dr. Olney Vieira da Motta, coordenador da Pós-Graduação neste período;

Aos professores, pelo apoio científico nas disciplinas realizadas, assim como pela assistência técnico-científica;

Às Médicas Veterinárias Msc. Maria de Lourdes Amaral Bernardino e Msc. Gina Nunes Teixeira, pelo suporte oferecido, pela companhia amigável e auxílio;

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Jovana e Conceição, pelos prestativos auxílios ao longo deste período;

Aos Professores Dr<sup>a</sup>. Caterina Guzman-Verri e Dr. Edgardo Moreno, professores e pesquisadores na Universidad Nacional de Costa Rica, pela assistência teórica e atenção dispensada;

Ao Médico Veterinário Msc. Farlen José Bebber Miranda, pelo apoio e colaboração;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela bolsa de Doutorado;

Aos meus colegas de laboratório, por toda atenção, apoio e momentos juntos;

Aos Professores Dr. Márcio Manhães Folly, Dr. Olney Vieira da Motta e Dr. Milton Masahiko Kanashiro, pela dedicação, colaboração e apoio;

Meus sinceros agradecimentos.

"Mude suas opiniões, mantenha seus princípios. Troque suas folhas, mantenha suas raízes."

(Victor Hugo, 1802-1885)

"O Senhor é o meu pastor; nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos. Guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma. Guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome."

Salmo 23, 1-3

## RESUMO

GARCIA, Luize Néli Nunes, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2013. Avaliação da resposta imune em galinhas contra *Brucella abortus* por meio da produção de IgY e quantificação da expressão de genes de virulência regulados pelo sistema de dois componentes BvrR/BvrS

*Brucella* é um patógeno intracelular e extracelular facultativo, cocobacilo Gram-negativo imóvel que infecta fagócitos e células epiteliais dos animais domésticos e silvestres, assim como em humanos. As pesquisas de novas vacinas atenuadas estão baseadas na identificação dos fatores de virulência da *Brucella*, sendo que o agente não possui fatores de virulência clássicos. Devido aos epítomos comuns presentes na *B. abortus*, *B. mellitensis* e *B. suis*, a maioria dos testes sorológicos para a detecção de anticorpos utiliza antígenos de *B. abortus* e principalmente o LPS. Este trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, foi avaliada a resposta imune de galinhas frente à *Brucella abortus* inativada e LPS (1119-3), por meio da cinética de produção de IgY, produzindo testes de validação imunológicos de alta afinidade, baixo custo e em concentrações adequadas ao uso como reagente para a identificação do agente. O fato de as análises da Porcentagem de Inibição Relativa (%I) e Positividade Relativa (%P), resultantes do ELISAc, apresentarem sensibilidade e especificidade adequadas somente contribuem para o uso do IgY como uma ferramenta em testes imunológicos para *Brucella*, já que se equipara às alternativas existentes preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). No segundo capítulo, são apresentados resultados da padronização e quantificação da expressão de genes de virulência, diretos e indiretos, regulados pelo Sistema de dois componentes BvrR/BVR em *Brucella*, utilizando-se a técnica de RT-PCR e High Resolution Melting. Genes de diferentes categorias de função biológica foram standardizados no presente trabalho, incluindo alguns relacionados à resposta a estímulos de internalização da célula bacteriana, classes que podem ser utilizadas em ensaios de virulência, como biomarcadores moleculares. Ambos os trabalhos corroboram os estudos em andamento no laboratório e com a possibilidade de estudos sobre os temas abordados.

**Palavras-chave:** 1. *Brucella abortus*, 2. Genes de virulência, 3. IgY, 4. Validação imunológica

## ABSTRACT

GARCIA, Luize Néli Nunes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. November, 2013. Evaluation of the immune response of chickens against *Brucella abortus* by the kinetics of IgY production and quantification of the expression of virulence genes regulated by two-component system BvrR/BvrS.

*Brucella* is an intracellular and extracellular facultative pathogen, Gram-negative coccobacillus that infects phagocytes and epithelial cells of wild and domestic animals, and humans. The research of new attenuated vaccines is based on identification of virulence factors of *Brucella* being that the agent has no virulence classic factors. Because the common epitope present in *B. abortus*, *B. mellitensis* and *B. suis*, most of serologic tests for the detection of antigens using antibodies to *B. abortus* and mostly LPS. This work is divided into two chapters. The first chapter evaluated the immune response of chickens against *Brucella abortus* inactivated and LPS (1119-3) using the kinetics of production of IgY and production of validation tests with high affinity, low cost and suitable for use as reactant concentrations for identifying the agent. The fact of the analyzes of Relative Percent inhibition ( % I) and Relative positivity ( % P), resulting from cELISA, submit adequate sensitivity and specificity only contributes to the use of IgY as a tool in immunological tests for *Brucella* since it equates alternatives recommended by the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT). Results of standardization and quantification of the expression of virulence genes, regulated by two-component system BvrR/ BvrS in *Brucella* using the technique of RT-PCR and High Resolution Melting are presented in the second chapter. Genes of different categories of biological function were standardized in this work, including some related to response to inducement of internalisation of the bacterial in host cell and classes that can be used in virulence assays as molecular biomarkers. Both studies corroborate with ongoing studies in the laboratory and with the possibility of studies on the topics covered

**Key-words:** 1. *Brucella abortus*, 2. Virulence genes, 3. IgY, 4. Immunological.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	12
2	<b>CAPÍTULO 1 - Avaliação da resposta imune de galinhas frente à <i>Brucella abortus</i> inativada e LPS (1119-3) por meio da cinética de produção de IgY e análises em testes de validação imunológicos.</b>	15
2.1	Introdução	16
2.1.1	Etiologia	16
2.1.2	Patogenia	17
2.1.3	Lipopolissacarídeo - LPS	19
2.1.4	Diagnóstico	21
2.1.4.1	Métodos Indiretos	21
2.1.5	Imunologia de Galinha	23
2.1.5.1	IgY	23
2.1.5.2	Estrutura e propriedades da IgY	24
2.1.5.3	Produção, extração e purificação da IgY	25
2.1.5.4	Vantagens da produção de anticorpos em gemas de ovo	26
3	<b>OBJETIVOS</b>	28
3.1	Objetivos Gerais	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
4.1	Animais	29
4.1.1	Aves (Poedeiras)	29
4.1.1.1	Coleta e Armazenamento de amostras	30
4.2	Produção de Imunoglobulinas Y (IgY)	30
4.2.1	Antígenos e Imunizações	30
4.2.1.1	Imunização	30
4.2.1.1.1	<i>Brucella abortus</i>	31
4.2.1.1.2	IgG bovino	32
4.2.1.1.3	Lipopolissacarídeo	33
4.3	Purificação de anticorpos IgY	33
4.4	Quantificação de proteínas	34
4.5	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	35
4.6	Western Blotting	35
4.7	ELISA	36
4.8	Análises estatísticas	37
5	<b>RESULTADOS</b>	38
5.1	Análises dos soros das poedeiras frente às diferentes etapas de imunizações	38
5.2	Análises dos extraídos das gemas frente às diferentes etapas de imunizações e antígenos	39
5.3	Análise das proteínas brucélicas utilizadas no sorodiagnóstico e na imunização	41
5.4	Avaliação das extrações, purificações e quantificações proteicas das gemas	42
5.5	Perfil de resposta dos animais imunizados com os antígenos utilizados, LPS, <i>B. abortus</i> 1119-3 e IgG bovino	44
5.6	Análise estatística relacionada à escolha das IgY a serem utilizadas nos ELISAs competitivos (ELISAc) para padronização	47

5.7	ELISAs competitivos (ELISAc) e seus respectivos testes estatísticos	48
6	<b>DISCUSSÃO</b>	51
7	<b>CONCLUSÕES</b>	54
2	<b>Capítulo 2 - Quantificação da expressão de genes de virulência, diretos e indiretos, regulados pelo Sistema de dois componentes BvrR/BvrS em <i>Brucella</i></b>	55
2.1	<b>INTRODUÇÃO</b>	56
2.1.1	<i>Brucella</i>	56
2.1.2	Patogenia	56
2.2	Vida intracelular da <i>Brucella</i> spp.	59
2.2.1	Internalização da <i>Brucella</i> spp.	59
2.2.2	Interação com a via endossomal inicial	60
2.2.3	Interação com o autofagossoma	61
2.2.4	Interação com o Retículo Endoplasmático e a multiplicação bacteriana	62
2.3	Fatores envolvidos na virulência da <i>Brucella</i>	64
2.3.1	Sistema de Secreção tipo IV	64
2.3.2	Regulador transcricional VjbR	65
2.3.3	Sistema de dois Componentes BvrR/BvrS	66
2.4	Modelo do funcionamento do sistema de dois componentes e outros fatores de virulência	71
3	<b>OBJETIVOS</b>	74
3.1	Objetivo Geral	74
3.2	Objetivos Específicos	74
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	75
4.1	Curva de crescimento e preparo das amostras	75
4.2	Extração de RNA total	76
4.3	Síntese de cDNA	78
4.4	Desenho dos iniciadores	78
4.5	Padronização das reações de RT-PCR por HRM (High Resolution Melting) com o gene de referência L7L12	79
4.6	Padronização e análise das reações de RT-PCR por HRM dos genes de virulência diretos e indiretos	81
5	<b>RESULTADOS</b>	83
5.1	Obtenção da curva de crescimento para <i>B. abortus</i> 2308	83
5.2	Padronização das reações de RT-PCR	83
5.3	Análise da expressão do gene de referência	84
5.4	Análise da expressão dos genes de virulência	85
5.5	Análise de RT-PCR dos genes L7L12/BvrR -2/ Omp25/ ExoR -2	94
6	<b>DISCUSSÃO</b>	96
7	<b>CONCLUSÕES</b>	99
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	100
	<b>ANEXOS</b>	117

## 1 – Introdução Geral

*Brucella* é um patógeno intracelular e extracelular facultativo, cocobacilo Gram-negativo imóvel que infecta os fagócitos e células epiteliais dos animais domésticos e silvestres, assim como os dos humanos (Moreno e Moriyón, 2006).

Nos animais, a enfermidade se manifesta com abortamentos e infertilidade. Somente na América Latina, as perdas econômicas na produção animal causadas pela brucelose foram estimadas em 600 milhões de dólares (Boschioli et al., 2001; López-Goñi & Moriyón, 2004; Rotz, et al., 2002).

Uma das principais ferramentas no controle da brucelose é a vacinação. As vacinas mais utilizadas mundialmente para esta enfermidade são produzidas com cepas lisas atenuadas de *B. abortus*, sendo que as mesmas têm alguns inconvenientes: são virulentas para os animais prenhes e causam interferência nos diagnósticos sorológicos clássicos (Hoover et al., 2004; Nicoletti, 1990; Schurig et al., 2002).

O programa nacional de controle e erradicação da brucelose no Brasil baseia-se na vacinação em massa do rebanho e no abate dos animais considerados reagentes no sorodiagnóstico. A presença do lipolissacarídeo (LPS) na superfície celular da *Brucella* representa a porção mais imunogênica deste agente externamente. Devido aos epítomos comuns presentes na *B. abortus*, *B. mellitensis* e *B. suis*, a maioria dos testes sorológicos para a detecção de anticorpos utiliza antígenos de *B. abortus*, principalmente o LPS (OIE, 2000).

As pesquisas de novas vacinas atenuadas estão baseadas na identificação dos fatores de virulência da *Brucella* sendo que o agente não possui fatores de virulência clássicos e, além disso, possuem PAMP's (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), que permitem a bactéria escapar da detecção do Sistema Imune Inato e romper as barreiras do hospedeiro

(Barquero-Calvo et al., 2007; Grilló et al., 2006; Moreno & Moriyon, 2002; Palacios-Chaves et al., 2011).

Dentre os fatores de virulência mais estudados estão o lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella* (BaLPS), o regulador transcricional VjBR, o sistema de secreção VirB tipo IV e Glicanos  $\beta$ -1,2 cíclicos periplásmicos (C $\beta$ Gs). Estes fatores permitem que o patógeno alcance seu local de replicação final no Retículo Endoplasmático (Arellano-Reynoso et al., 2005; Celli et al., 2003; Chaves-Olarte et al., 2012; Delrue et al., 2005; Lapaque et al., 2005; Uzureau et al., 2007).

Além dos fatores mencionados acima, podemos citar o Sistema regulador e sensorial de dois componentes BvrR/BvrS. Este sistema está composto pelo sensor (BvrS), caracterizado por ser um homodímero localizado na membrana celular e um regulador citoplasmático (BvrR) (López-Goñi et al., 2002; Sola-Landa et al., 1998).

Segundo Sola-Landa et al. (1998), o sistema regulador de dois componentes está diretamente relacionado à virulência da *Brucella*. Os mutantes BvrR/BvrS são avirulentos em camundongos, apresentam invasividade reduzida nas células, além de deficiência no recrutamento de GTPases, requeridas para a penetração nas células. Além disso, tornam-se incapazes de se replicar intracelularmente (Guzmán-Verri et al., 2001; Sola-Landa et al., 1998).

A importância do Sistema de dois componentes está em sua capacidade de controlar a composição de pelo menos duas proteínas da membrana externa, a Omp (Out membrane protein) 3a e Omp 3b, assim como a estrutura do LPS, possíveis aspectos do metabolismo patogênico, e está relacionado diretamente ao mecanismo de invasão e multiplicação intracelular (Chaves-Olarte et al., 2002; Guzmán-Verri et al., 2002; Lamontagne et al., 2009; Manterola et al., 2005; Sola-Landa et al., 1998; Viadas et al., 2010).

Acredita-se que o Sistema BvrR/BvrS é ativado ou inativado para conseguir ajustes no metabolismo e garantir a sobrevivência nos ambientes

extracelulares e intracelulares (Guzmán-Verri et al., 2002; Kohler et al., 2002; Lamontagne et al., 2009; Moreno e Moriyon, 2002; Sola-Landa et al., 1998).

Assim sendo, este trabalho se divide em dois capítulos. Com o primeiro capítulo, pretende-se desenvolver um processo de obtenção de preparações de IgY contendo anticorpos anti-*Brucella abortus* 1119-3 e anti-LPS específicos, de alta afinidade, baixo custo e em concentrações adequadas ao uso como reagente para a identificação do agente. Já o segundo capítulo, trata de padronizar e quantificar a expressão de genes de virulência, diretos e indiretos, regulados pelo Sistema de dois componentes BvrR/BVR em *Brucella*, utilizando-se a técnica de RT-PCR e High Resolution Melting.

**2 - Capítulo 1: Avaliação da resposta imune de galinhas frente à *Brucella abortus* inativada e LPS (1119-3) por meio da cinética de produção de IgY e análises em testes de validação imunológicos**

## 2.1 – Introdução

### 2.1.1 – Etiologia

Antigenicamente, as brucelas são divididas em dois grupos distintos: as lisas ou clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas ou não clássicas (*B. ovis*, *B. canis* e *B. maris*). *B. abortus* subdivide-se em oito biótipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19), a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3) e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, apesar de apresentarem variantes, não se subdividem em biótipos (Corbel, 1997).

Mundialmente, as principais espécies patogênicas para os animais domésticos são a *B. abortus*, responsável pela brucelose bovina; *B. melitensis*, agente etiológico da brucelose em caprinos e ovinos; e a *B. suis*, responsável pela brucelose suína (Godfroid et al., 2005).

Embora exista predileção por espécies animais que infectam, não existe especificidade quanto a este sentido, podendo as brucelas inclusive serem isoladas de animais silvestres, sendo considerados reservatórios zoonóticos da brucelose (Godfroid, 2002).

O gênero *Brucella* tem como características taxonômicas serem cocobacilos ou bacilos curtos com 0.5 a 0.7 µm de diâmetro e 0,6 a 1,5 µm de comprimento, dispostos em pares e, menos frequentemente, em pequenos grupos. A morfologia da *Brucella* spp. é normalmente constante, exceto em culturas antigas, quando adota formas pleomórficas. São Gram negativos, imóveis e não possuem flagelos (Corbel, 1997).

*Brucella* possui características peculiares que a diferencia de outras enfermidades infectocontagiosas. Dentre estas características, está uma série de fatores dependentes da *Brucella* e do hospedeiro, que influem na evolução da enfermidade no hospedeiro, com importantes repercussões no estado sanitário do rebanho e, portanto, importante na epidemiologia da enfermidade (León, 1994).

### 2.1.2 – Patogenia

*Brucella* é um microrganismo de localização e multiplicação intracelular facultativa, podendo se multiplicar no interior de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares após sua fagocitose. No interior dos polimorfonucleares, este microrganismo pode sobreviver durante prolongado período de tempo, existindo a possibilidade de que a evolução da enfermidade dependa da capacidade bactericida destas células (León, 1994).

O gênero não possui fatores de virulência clássicos, como endotoxinas e exotoxinas e exibe tendência para invadir e persistir no hospedeiro por meio da inibição da morte celular programada (Detilleux et al., 1991).

As brucelas ingressam no hospedeiro pelas mucosas dos tratos digestivo, genital, respiratório e pelas mucosas conjuntivas ou então por soluções de continuidade da pele. Então são carregadas até os linfonodos e fagocitadas, principalmente por macrófagos, local onde podem permanecer quiescentes por meses (Arenas et al., 2000).

Após a fagocitose, a maioria das brucelas é eliminada pela fusão fagolisossomal, quando somente 15 a 30% sobrevivem, por estarem envoltas por compartimentos acidificados (Arenas et al., 2000). A formação deste ambiente não está completamente elucidada, porém se sabe que este é responsável por limitar a ação de antibióticos e explicar a discrepância entre estudos *in vitro* e *in vivo* (Pizarro-Cerda et al., 1998).

A replicação da bactéria acontece no retículo endoplasmático sem afetar a integridade da célula hospedeira. Após a replicação, o microrganismo é liberado pela ação de hemolisinas e indução de necrose celular (Gorvel e Moreno, 2002).

Através da corrente circulatória, estes chegam aos órgãos de predileção (baço, fígado, linfonodos), ou seja, naqueles em que há maior disponibilidade

de elementos necessários para o seu metabolismo, a saber, com destaque dos produtos da degradação dos hormônios esteroides, a Prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2  $\alpha$ ) e o Estradiol - 17 $\beta$  (E17  $\beta$ ), além de outras progestinas (Quinn et al., 1994). Acredita-se que os produtos da degradação desses hormônios sejam talvez utilizados no metabolismo das brucelas, que colonizam e multiplicam-se dentro dos trofoblastos (Meador e Deyoe, 1989).

O eritrol é outro metabólito que merece destaque na patogenia da brucelose, está presente no útero gravídico, tecidos mamários e ósteo-articulares, e órgãos do sistema reprodutivo masculino: testículo, epidídimo e vesícula seminal (OMS, 1986). A oferta de eritrol cresce em razão direta da evolução da gestação, porém apresenta alta concentração, chegando ao máximo aos 5 meses de gestação (Samartino et al., 1996).

A multiplicação da *Brucella* no ambiente uterino desencadeia uma reação inflamatória dos placentomas, que evolui para necrose, lise das vilosidades e subsequente deslocamento do cotilédone e da carúncula. Nos cursos agudos, esse processo desencadeia o abortamento. Porém, quanto menos intensa for a necrose, maior será a deposição de fibrina entre as vilosidades e, mais tardio, o abortamento, podendo a gestação vir a termo, gerando produtos que sobrevivem poucos dias. Excesso de retenção de fibrina leva à retenção de placenta. As lesões também diminuem a circulação materna fetal, comprometendo a respiração e a alimentação do produto, levando-o à morte, que também pode ser causada pelas próprias bactérias, caso estejam em concentração elevada no âmnion. O quadro pode evoluir para metrite ou endometrite crônicas, gerando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade, em geral apresentando secreção vaginal (Paulin, 2006).

Cerca de duas semanas após a expulsão do produto, quando o útero entra em repouso e a bactéria migra para outros órgãos ativos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, pode ocorrer mastite crônica sem lesões aparentes ou mudanças das características do leite (Batheke, 1988).

A bactéria é eliminada em grandes quantidades pelo animal infectado, pelos produtos do abortamento ou parto e pela secreção vaginal durante todo o

puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de novos animais. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e persiste por meses (Acha e Szyfres, 2003).

Na infecção aguda de brucelose, é esperado que as brucelas, distribuídas por via hematogênica, estejam presentes em todos os órgãos das fêmeas (Gallien et al., 1998). Em ruminantes, não há imunidade transferida da mãe para o feto através da placenta, mas pelo colostro após o nascimento, sendo que as moléculas intactas de imunoglobulinas são absorvidas pela parede do trato gastrointestinal destes apenas até as primeiras 36 horas de vida (Paulin, 2001). Neste momento, animais que estejam infectados acabam comprometendo o recém-nato.

### **2.1.3 – Lipopolissacarídeo (LPS)**

Muitos estudos de fatores de virulência são conduzidos para os principais componentes da membrana externa. A membrana externa da *Brucella* contém o LPS que é, para este agente, o fator de maior virulência (Cardoso et al., 2006).

O LPS é vital tanto estruturalmente quanto para a integridade funcional das bactérias Gram negativas. Além disso, é um dos principais alvos do sistema imune inato dos mamíferos. A *Brucella*, particularmente, possui um atípico LPS, quando comparado com os obtidos das enterobactérias, tais como, o da *Escherichia coli* (Lapaque et al., 2005).

O LPS é uma molécula complexa que consiste em uma região polissacarídica O-específica (Antígeno-O, Ag-O), uma região polissacarídica conservada (Core) e um componente lipídico chamado Lipídeo A, esquematizado segundo Cardoso et al. (2006) na Figura 1.

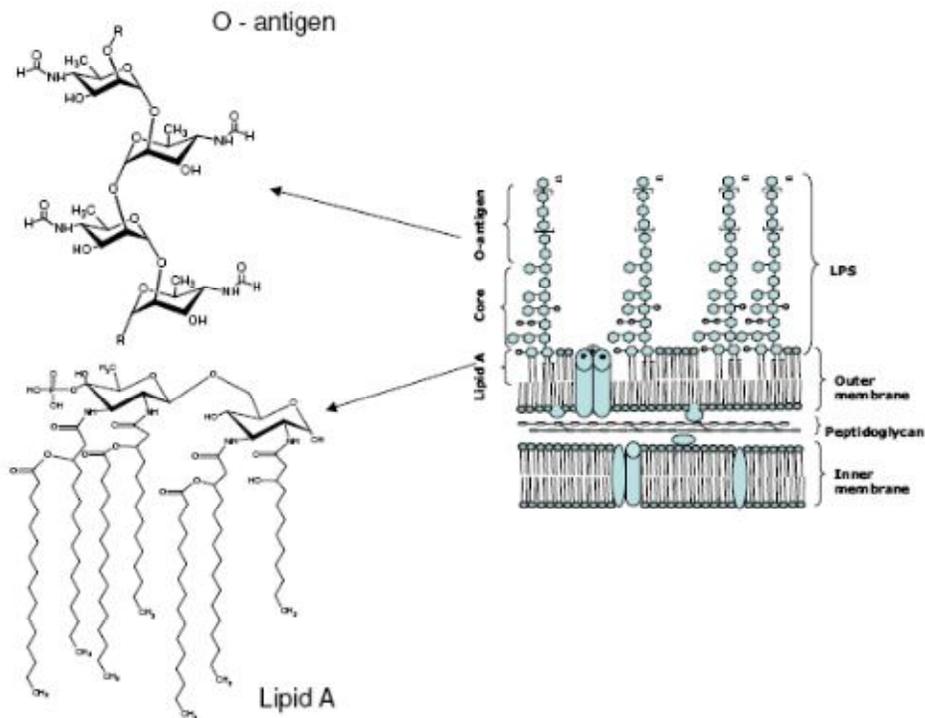


Figura 1: Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo (LPS) da *Brucella* spp., demonstrando sua constituição pelo lipídio A, pela região conservada (Core) e pelo antígeno-O (Cardoso et al., 2006).

O reconhecimento do LPS pelas células, principalmente os monócitos e macrófagos, evoluiu por muitos séculos, para proporcionar aos hospedeiros mamíferos um rápido reconhecimento e uma reação rápida diante das bactérias Gram negativas (G-). Esta rápida e inata resposta contra o LPS comumente envolve a liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, tais quais TNF- $\alpha$ , IL-6 (Interleucina-6), IL-12 e IL-1 $\beta$ , que, em sítios locais de infecção e em níveis moderados, beneficia o hospedeiro por promover a inflamação e, de outro modo, prepara o sistema imune para eliminar o microrganismo invasor (Erridge et al., 2002).

O reconhecimento do LPS bacteriano é mediado por CD14, entretanto, este precisa de domínios transmembranares e intracelulares para sinais de transdução que, desta forma, requer o envolvimento de moléculas pertencentes à família TLR. A descoberta das proteínas TLR, família de receptores de

reconhecimento padrão em mamíferos, forneceu melhor entendimento do mecanismo com o qual a *Brucella* spp. pode estimular a resposta celular, induzindo os monócitos a produzirem IL-12, sendo este efeito bloqueado por anticorpos anti-CD14, sugerindo que a aglutinação do agente e/ou sinalização perante os monócitos seja mediada via LPS (Zaitseva et al., 1996).

## **2.1.4 – Diagnóstico**

### **2.1.4.1 - Métodos indiretos**

Os programas de combate à brucelose baseiam-se no sorodiagnóstico, levando-se em conta os testes a serem aplicados, as suas características intrínsecas, o custo e a praticidade de execução.

As principais classes de imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo bovino são a G (IgG1 e IgG2) e a M. A distribuição entre estas classes de imunoglobulinas e o tempo necessário para a detecção das mesmas está associada a diversos fatores, como o estágio da doença e a vacinação. A IgM é a primeira imunoglobulina detectada nos testes sorológicos, sendo imediatamente seguida pela IgG1 e, posteriormente, por pequenas quantidades de IgG2 e IgA. Na maioria das reações cruzadas resultantes da exposição a outros microrganismos, a principal imunoglobulina envolvida é a IgM (Nielsen et al., 2004).

A presença do lipopolissacarídeo O (OPS), presente na superfície celular da *Brucella* spp., representa a porção mais imunogênica deste agente. Devido a epítomos comuns, presentes em *B. abortus*, *B. Melitensis* e *B. suis*, a maioria dos testes sorológicos para detecção de anticorpos utiliza antígenos de *B. abortus* (OIE, 2000).

A escolha dos métodos sorológicos a serem empregados, seja individualmente ou em programas de controle e erradicação, irá depender de

vários fatores, tais como, a espécie animal, a população sob vigilância, as taxas de prevalência e incidência e a aplicação de vacinas vivas (Heck et al., 1986).

O desempenho dos testes utilizados no sorodiagnóstico da brucelose baseia-se principalmente na detecção do anticorpo IgG<sub>1</sub>, o mais prevalente em animais naturalmente infectados (León, 1994).

Os testes oficiais do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Brasil são o do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), o 2-mercaptoetanol (ME) e o teste de Fixação do Complemento (FC) (BRASIL, 2004).

O AAT é um teste qualitativo, rápido, barato, de simples execução e possui ótima sensibilidade e boa especificidade, sendo a melhor alternativa para o diagnóstico em massa (OIE, 2005). Foi desenvolvido a partir da observação de que a IgG<sub>1</sub> bovina é menos ativa em pH 7.0, mudando de comportamento com a acidificação do meio. O pH 3.65 ~ 0.5 aumenta o poder de aglutinação da IgG<sub>1</sub> e reduz a reatividade da IgM (BRASIL, 2004).

O ME inativa a atividade aglutinante do anticorpo IgM mediante processo químico, reduzindo as pontes dissulfídicas da sua estrutura pentamérica, degradando-a em subunidades não aglutinantes. O teste detecta tanto anticorpos IgG<sub>1</sub> como IgG<sub>2</sub> (Nielsen et al., 1984). Além disso, o tratamento com o ME pode provocar aumento da sensibilidade dos testes pela otimização da reatividade de IgG<sub>1</sub> (León, 1994). Assim, além do ME possuir boa especificidade, também apresenta boa sensibilidade relativa (Paulin et al., 2002).

O teste FC é o que apresenta melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (Nielsen, 1995), o que levou a sua adoção a padrão-ouro para a avaliação de outros testes sorológicos. O Código Zoossanitário Internacional refere-se ao FC como importante suporte técnico, sendo este o teste exigido para o comércio internacional de animais e produtos de origem animal (OIE, 2005). Nielsen (1995) cita o anticorpo IgG<sub>1</sub> como o único detectado no FC em bovinos, o que eleva sua especificidade e, geralmente, não interfere no seu desempenho, visto o anticorpo IgG<sub>1</sub>

predominar sobre a classe IgG<sub>2</sub> em animais infectados (Paulin et al., 2002). Alton (1978) assevera que a FC sofre menos interferência de anticorpos vacinais do que as provas de aglutinação.

## **2.1.5 – Imunologia da galinha**

### **2.1.5.1 – IgY**

Por muitos anos, a imunoglobulina predominante no soro das aves foi chamada de IgG. Entretanto, a imunoglobulina das aves tem uma maior cadeia pesada, um ponto isoelétrico menor, e sua polimerização é dependente de sal. Devido a essas diferenças, Leslie e Clem (1969) sugeriram a caracterização desta imunoglobulina como uma classe diferente, chamando-a assim de IgY. Porém, somente quando teve sua sequência de aminoácidos e a filogenia analisada é que a classificação foi realmente justificada (Warr et al., 1995; Sharma, 1997).

McCully et al. (1962) realizaram a caracterização eletroforética dos componentes da gema, inclusive da IgY. Tais autores verificaram que a IgY, ou  $\gamma$ -livetina, é um anticorpo de baixo peso molecular (LMW – Low Molecular Weight), e que se localizava na porção plasmática da gema (fração solúvel) em associação com as  $\alpha$  e  $\beta$  – livetinas, em uma zona muito próxima à de uma lipofosfoproteína de baixa densidade. Sugeriram, ainda, a separação das frações plasmática e não solúvel (grânulos) por diluição inicial com água e posterior centrifugação.

A imunização de galinhas com soroalbumina bovina (BSA) foi usada por Patterson et al. (1962 a, b), com a finalidade de estudar a emergência de anticorpos anti-BSA no soro e sua transferência para a gema através do epitélio folicular do ovário. Rose et al. (1974) também demonstraram que a IgY é eficientemente transportada e acumulada na gema.

A partir do método de precipitação com o método de polietilenoglicol (PEG), Polson et al. (1980) conseguiram obter preparações homogêneas de anticorpos a partir de gemas de ovos de galinha. Os resultados foram reproduzidos um pouco depois por Jenesius et al. (1981) e por Bade e Stegemann (1984). A obtenção de anticorpos a partir de gema apresenta vantagens como rapidez, baixo custo e menor grau de agressão ao animal, apesar do certo grau de dificuldade em separar os anticorpos da fração lipídica (McLaren et al., 1994).

Na década de 90, ressurgiu o interesse pelo uso de IgY de aves em imunoterapia e imunodiagnóstico (Larsson et al., 1991; Fichtali et al., 1993 e Akita e Nakai, 1993).

#### **2.1.5.2 – Estrutura e propriedades da IgY**

A IgY possui uma típica estrutura de imunoglobulina de 7S com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Possui massa molecular de 180kDa, o que a torna maior que a IgG, diferenciando-as. As cadeias pesadas possuem uma região variável e quatro domínios constantes, com massa molecular de 66kDa. As cadeias leves, com aproximadamente 22kDa, apresentam uma região variável em uma região constante (Leslie e Clem, 1969; Warr et al., 1995).

As sequências da região FC em IgY apresentam domínios Cv3 e v4 que aparecem estar relacionados com os domínios Cy2 e Cy3 da IgG, estando o domínio Cv2 ausente nas cadeias  $\gamma$ , sugerindo uma condensação para formação de região de dobradiça da IgY (Warr et al., 1995).

O comportamento da IgY frente a antígenos diferentes foi estudado por vários pesquisadores. Estes demonstraram que a propriedade de precipitação ou aglutinação só é exibida quando a imunoglobulina se liga fortemente ao antígeno em presença de altas concentrações de sal (~1.5M), o que

intrinsecamente parece estar relacionado à conformação dos braços Fab da IgY (Warr et al., 1995).

### **2.1.5.3 – Produção, extração e purificação da IgY**

A gema do ovo é uma mistura complexa composta de uma fase granular, com grânulos microscópicos, não solúveis em água, e de uma fase denominada plasma, solúvel em água. O plasma é formado por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e por proteínas, as livetinas. Os grânulos contêm 70% de lipovitelinas, 16% de fosvitina e 12% de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As lipovitelinas podem ser consideradas como lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Kim e Nakai, 1996).

O isolamento de IgY da gema do ovo de galinhas hiperimunizadas com diferentes antígenos foi feita por muitas metodologias diferentes. Para a separação das lipoproteínas da IgY, foram usados propanodiol (Bade e Stegemann, 1984), polietilenoglicol (Polson et al., 1980), sulfato de dextran (Jenesius et al., 1981) e alginato de sódio (Hatta et al., 1988). O uso da agregação das lipoproteínas em baixas forças iônicas, como a água, foi relatado por Jenesius et al. (1981). Kwan et al. (1991), Akita e Nakai (1992); Fichtali et al. (1993) usaram diluição em água, seguida por centrifugação ou filtração, para o fracionamento dos componentes solúveis dos insolúveis da gema do ovo.

O pH e o volume da diluição, segundo Akita e Nakai (1992), são fatores críticos na extração da IgY pelo método de diluição em água. Segundo estes autores, a gema deve ser diluída seis vezes com água com pH 5.0, seguida de precipitação do sobrenadante (plasma) com sulfato de amônia e posterior centrifugação ou precipitação com álcool ou com sulfato de sódio.

Muitos pesquisadores têm proposto que a purificação final de IgY em associação com métodos cromatográficos, incluindo a cromatografia por interação hidrofóbica e gel filtração (Hassi e Aspöck, 1988), gel filtração e

cromatografia por troca iônica (Fichtali et al., 1993) e DEAE-celulose (Bade e Stegemann, 1984).

A ultrafiltração foi outro método aplicado à fração solúvel em água, após repouso a 4°C ou centrifugação, método este utilizado por Akita e Nakai (1993) e por Kim e Nakai (1996).

Akita e Nakai (1993) concluíram que o método de diluição em água, pH 5.0-5.2, com repouso a 4°C ou centrifugação, seguido de precipitação com sulfato de sódio, ultrafiltração ou álcool precipitação, ou precipitação com sulfato de sódio, e finalmente, gel filtração/troca iônica, seria o melhor método em termos de produção em larga escala.

McLaren et al. (1994) extraíram e purificaram a fração imunoglobulínica da gema do ovo de galinhas hiperimunizadas com  $\alpha$ -lactoalbumina, mediante a combinação do tratamento da gema com ácido caprílico e sulfato de amônia. Na primeira etapa, ocorreu a separação das lipoproteínas e albuminas da IgY e, na segunda etapa, uma precipitação e concentração da fração IgY.

#### **2.1.5.4 – Vantagens da produção de anticorpos em gemas de ovo**

As galinhas produzem altos níveis de anticorpos contra antígenos de mamíferos, mesmo quando imunizados com pequenas quantidades destes antígenos. O uso de adjuvante completo de Freund, nos esquemas de imunização, leva a um aumento do título de anticorpos que se mantém por um longo período, principalmente na segunda fase da resposta (Gassmann et al., 1990).

Gamenicsh et al. (2000) destacam a eficiente transferência de IgY para a gema de galinhas e a sua capacidade de detecção de antígeno por diferentes técnicas, além de demonstrar que a sua aplicação é mais vantajosa quando comparada a dos monoclonais.

A distância filogenética torna vantajosa o uso da IgY, se comparada à da IgG de mamíferos, já que aumenta a especificidade a antígenos (Crosby et al.,

1994), diminui o custo e há facilidade na coleta de ovos (Polson et al., 1980), além de haver possibilidade da utilização em testes sorológicos e diagnósticos de diversas etiologias e quantificação de anticorpos (Larsson et al., 1991).

As propriedades imunológicas de IgY estão diretamente ligadas ao seu uso em imunoterapias e imunodiagnóstico, já que esta não se liga a receptores Fc de mamíferos e, portanto, não ativa o sistema complemento humano (Larsson et al., 1992), não reage com fator reumatoide e nem com anticorpos IgG humano anticamundongo (HAMA- *Human Anti-Mouse IgG Antibodies*) (Larsson et al., 1991), nem com a proteína A de estafilococos e G de estreptococos, além de demonstrar pouca reatividade cruzada com a IgG de mamíferos (Akita e Nakai, 1993).

A IgY também pode ser submetida aos mesmos processos de marcação de anticorpos que os anticorpos de mamíferos, tais como os descritos para biotina, FITC e peroxidase (Carlander et al., 1999).

### 3 – Objetivos

#### 3.1 - Gerais

Desenvolver um processo de obtenção de preparações de IgY contendo anticorpos anti-*Brucella abortus* 1119-3 e anti-LPS específicos, de alta afinidade, de baixo custo e em concentrações adequadas ao uso como reagente para identificação do agente.

#### 3.2 – Específicos

1. Verificar se o sistema imune de galinhas responde a *Brucella abortus*;
2. Delinear métodos de imunização adequados à produção desses anticorpos;
3. Verificar a cinética de produção de anticorpos IgY anti-*Brucella abortus* e sua transferência para a gema;
4. Purificar os anticorpos IgY da gema;
5. Testar se os anticorpos IgY anti- *Brucella abortus* 1119-3 e anti-LPS são capazes de identificar o agente;
6. Produzir IgY anti-IgG bovino;
7. Produzir metodologias de imunodiagnóstico com os IgY obtidos e efetuar sua padronização.

## 4 – Material e Métodos

### 4.1- Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram mantidos, tratados e manuseados conforme as normas éticas internacionais que regulam o uso de animais em experimentação (Remfry, 1987).

As aves tiveram amostras de sangue colhidos da veia marginal da asa, utilizando seringas de 3 mL ou tubos *vacuntainer* e agulhas descartáveis. A coagulação foi feita em temperatura ambiente (T.A.) e, após isto, as amostras foram centrifugadas a 8000g por 10 minutos, para a obtenção do soro, e armazenadas em tubos de Eppendorf™, devidamente identificados em -20°C até o momento do processamento.

#### 4.1.1 – Aves (Poedeiras)

Foram utilizadas sete galinhas (*Gallus gallus*) da raça Hisex Brown, em fase inicial de postura, apresentando as seguintes características: peso médio de 1.7 Kg, fase de postura de aproximadamente 5-6 ovos/semana e idade de 6 meses. As aves foram mantidas em gaiolas individuais (25x40 cm), em condições adequadas para galinha de postura, e água corrente *ad libitum*.

Durante a etapa de imunização, o total de animais utilizados foi agrupado de forma a ficarem dois animais por antígeno utilizado (*B. abortus* 1119-3, LPS e IgG bovino) e um animal como controle.

O programa de luz das poedeiras está diretamente relacionado à qualidade de postura dos animais utilizados no período de trabalho, e se encontra no anexo 1.

#### 4.1.1.1 – Coleta e Armazenamento de amostras

Os ovos foram colhidos diariamente, datados, identificados individualmente e divididos semanalmente em duas alíquotas, de forma que as posturas efetuadas na segunda-feira, terça-feira e quarta-feira constituíssem a primeira alíquota, e aquelas realizadas na quinta-feira, sexta-feira, sábado e domingo constituíssem a segunda alíquota. O objetivo foi avaliar os níveis de anticorpos contra o antígeno programado para cada animal.

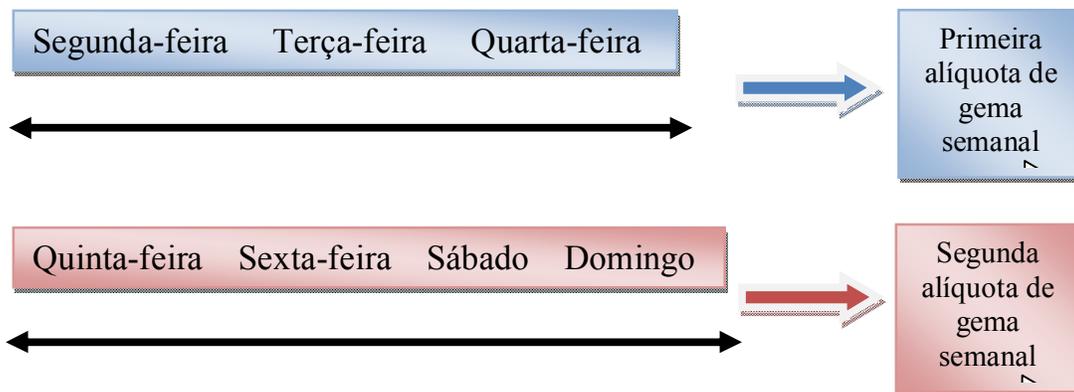


Figura 2: Demonstração de como foram efetuadas as alíquotas de gema individuais semanais.

## 4.2 – Produção de Imunoglobulinas Y (IgY)

### 4.2.1 – Antígenos e Imunizações

#### 4.2.1.1 – Imunização

Na etapa de imunização, foram utilizados sete animais, sendo distribuídos de forma a ficarem dois animais por antígeno (*B. abortus* 1119-3, LPS e IgG bovino (Sigma, EUA) e um animal de controle.

Os antígenos foram diluídos em PBS, pH 7.2, de forma que atingissem quantidades e concentrações ideais para cada inoculação, desde que perfizessem um volume total de 1 mL para cada antígeno. A emulsão resultante entre os antígenos específicos e o Adjuvante Completo de Freund (AFC - Sigma, EUA), na primeira inoculação, e com o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF – Sigma, EUA) nas etapas subsequentes, pelo uso do *tree way*, na proporção 1:2 (v/v), utilizada por via intramuscular (IM) no músculo peitoral. Sendo assim, foi utilizado um volume total por animal de 1 mL (0,5 mL de antígeno e 0,5 de adjuvante).

Os animais tiveram amostras de soro avaliadas, para titulação de anticorpos específicos, por ensaio de ELISA.

#### **4.2.1.1.1 – *Brucella abortus***

Frascos com suspensão de *B. abortus* cepa 1119-3 inativada, suspendida em solução fisiológica e fenolada 0,5%, cedida pela parceria com o Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) foram utilizadas neste experimento.

A solução foi lavada com PBS, pH 7.2, centrifugada, e teve a porção suspensa retirada, sendo este procedimento triplamente repetido, deixando o material com concentrações mínimas de fenol. O *pellet* resultante foi diluído em solução salina estéril (NaCl; 0,85%), de onde estimou-se, sob forma de absorvância pelo DENSIMAT® (BioMérieux, FR), a concentração de Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL), em condições desejadas para cada inoculação.

A etapa de imunização completa está demonstrada no Quadro 1.

As imunoglobulinas Y extraídas de gemas das poedeiras, inoculadas com os antígenos, foram utilizadas no diagnóstico direto, após conjugação com Biotina (Sigma, EUA), pormenorizadas nos itens seguintes.

Dia	Concentração/animal			Adjuvante
	<i>Brucella abortus</i> 1119-3	IgG bovino	LPS	
0	0.25 MacFarland $7.5 \times 10^7$ UFC/mL	1.0 mg	50 $\mu$ g	Completo de Freund
28	0.5 MacFarland $1.5 \times 10^8$ UFC/mL	1.5 mg	75 $\mu$ g	Incompleto de Freund
53	1.0 MacFarland $3.0 \times 10^8$ UFC/mL	2.0 mg	100 $\mu$ g	Incompleto de Freund
61	1.5 MacFarland $4.5 \times 10^8$ UFC/mL	2.0 mg	100 $\mu$ g	Incompleto de Freund
68	2.0 MacFarland $6.0 \times 10^8$ UFC/mL	3.0 mg	100 $\mu$ g	Incompleto de Freund

Quadro 1: Esquema de Imunização da *B. abortus* 1119-3, IgG bovino e LPS detalhando intervalo de dias da imunização, concentração de antígeno e adjuvante utilizado.

#### 4.2.1.1.2 – IgG bovino

As inoculações deste antígeno obedeceram às mesmas vias, volumes e procedimentos anteriormente citados. O esquema de inoculação e consequentemente, a concentração de IgG bovino obedeceu ao descrito no quadro 1.

O objetivo da sensibilização de galinhas com IgG bovino foi a obtenção de anticorpos para a realização de diagnósticos sorológicos indiretos, com a finalidade de obtenção de um teste com sensibilidade e especificidade igual ou superior aos existentes no mercado.

#### **4.2.1.1.3 – Lipopolissacarídeo**

As etapas de imunizações envolvendo o LPS obedeceram às mesmas vias, volumes e procedimentos anteriormente citados. O esquema de inoculação e, consequentemente, a concentração de LPS obedeceu ao descrito no quadro 1.

O extrato de lipopolissacarídeo (POLI O), obtido da amostra de *B. abortus* 1119-3, foi produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, de acordo com a técnica descrita por Cherwonogrodzky & Nielsen (1988).

A dosagem do açúcar total (AT) foi realizada pelo método de Dubois et al. (1956) com leitura de 490nm. O princípio da técnica é dar uma cor amarelo-laranja quando os polissacarídeos são tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado.

#### **4.3 – Purificação de anticorpos IgY**

As gemas foram previamente separadas da clara e lavadas com água corrente seguida de água destilada. O seu conteúdo foi removido por punção

com pipeta Pasteur e transferido para recipientes estéreis. Sequencialmente, as gemas foram diluídas com água destilada na proporção de 1:10 (v:v), acidificadas, pH 5.0, e deixadas em repouso por *over night* a 4°C. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de amônio (VETEC), sob agitação, em quantidade suficiente para atingir 20% de saturação (p/v). A solução foi mantida em T.A., sob agitação, por 2 horas, e novamente centrifugada a 10.000g por 30 minutos a 4°C. As soluções purificadas da gema contendo IgY, após concentradas, passaram por diálise contra PBS, pH 7.2 e, em seguida, foram submetidas à filtração esterilizante (0,22 µm). Posteriormente, as amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20°C.

#### **4.4 – Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas foi realizada, por meio de dosagem, pelo método do ácido bicinconínico (BCA - Sigma, EUA). Como proteína referência (padrão) foi utilizada a soro albumina bovina (BSA - Sigma, EUA) diluída na mesma proporção e comparada com o material testado.

Realizamos curvas de calibração de proteína padrão com BSA a 1mg/mL em seis poços com duplicata, possuindo respectivamente 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL do BSA em 10, 8, 6, 4, 2 e 0 µL de PBS, acrescentando 200 µL do reagente na proporção de 50 partes de ácido bicinconínico para uma parte de sulfato de cobre II. As amostras foram diluídas em diluições variantes entre 1:25 a 1:200, utilizando base 2, e transferidas em um volume de 10 µL em duplicata. Por último, foram adicionados 200 µL aos poços da placa, contendo o reagente ácido bicinconínico com sulfato de cobre II. As placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, sendo posteriormente lidas em espectrofotômetro em 570nm.

#### **4.5 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)**

As eletroforeses em géis de poliacrilamida foram realizadas em sistema descontínuo (Bio Rad Mini Protean II, EUA), constituído de gel separador a 12% de acrilamida, gel de empilhamento a 4% de acrilamida e tampão de corrida Tris-Glicina, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970).

As amostras foram preparadas em tampão de amostra, em concentrações equivalentes a 1,5 µg/µL, mantidas a 95°C por 5 minutos, aplicadas no gel em volume de 10µL por canaleta, e submetidas a uma corrente inicial de 160V/60A a 60 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com azul de coomassie, sob agitação lenta, 50 minutos e, depois, descorado com uma solução contendo 40% de metanol a 10% de ácido acético até a visualização das bandas.

#### **4.6 - Western Blotting**

As amostras de LPS, extrato brucélico e IgG bovino, foram submetidas a SDS-PAGE com gel contendo 12% de acrilamida. Em cada canaleta, foram aplicados 10 µL de amostra, em concentrações equivalentes às descritas no item anterior.

Ao término da corrida, o gel foi submetido à etapa de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore, EUA), segundo metodologia descrita por Towbin (1979).

O gel, a membrana de nitrocelulose e outros componentes do sistema de eletrotransferência foram imersos em tampão de transferência, e mantidos resfriados a 4°C até o momento de uso. Em seguida, o gel foi montado segundo orientações do fabricante Bio Rad (Bio Rad Laboratories, EUA). Este sistema foi submetido à corrente de 110V/ 250mA por 90 minutos. A seguir, a

membrana foi imersa em uma solução bloqueadora (PBS com 5% de leite em pó desnatado – Molico<sup>TM</sup> - Nestlé, BR), por 1 hora em T.A. ou por 14-16 horas a 4°C.

Após este período, as membranas foram incubadas por 2 horas em T.A., sob agitação constante, com soros das aves imunizadas e com as soluções purificadas das gemas, contendo IgY contra os antígenos correspondentes utilizados na etapa de sensibilização da membrana, diluídos 1:1000 em solução bloqueadora.

Na etapa seguinte, as membranas foram lavadas quatro vezes com PBST (PBS pH 7.4 com 1% de Tween 20) por 5 minutos cada lavagem, e incubadas com o segundo anticorpo, IgG de carneiro e anti-IgY de galinha, conjugados à peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:2000 em PBST por 1 hora em T.A. sob agitação. Em seguida, foram feitas mais quatro lavagens com PBST e a reação foi revelada com uma solução contendo substrato enzimático mais a substância cromógena 3,3' diaminobenzidina (DAB – Sigma, EUA). Assim que as bandas tornaram-se claramente visíveis, a reação foi interrompida pela adição de água destilada.

#### **4.7 – ELISA**

Os soros e os extraídos das gemas foram titulados pelo método de ELISA. A sensibilização da placa para o teste de ELISA foi feita com solução de proteína purificada ou LPS na concentração de 1-2 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6; incubação a 37°C por 1 hora, lavagem com PBS, contendo 0,05% de tween 20 (PBST), bloqueio com gelatina 1% diluída em PBS (PBSG) em uma proporção de três vezes o volume utilizado para sensibilizar a placa, deixando 1 hora em T.A.

A lavagem da placa, após o bloqueio, foi feita com PBST. Os poços foram preenchidos com 100 µL dos respectivos soros ou extraídos, diluídos em PBSTG nas proporções de 1:400 a 1:51200, utilizando base 2, incubação a

37°C por 45 minutos e lavagem da placa com PBST. O conjugado (Anti-Chicken - Sigma, EUA) foi diluído em uma proporção de 1:2000 em PBSTG (após prévia análise) e os poços foram preenchidos com 50 µL deste preparado e incubado a 37°C por 1 hora. O passo seguinte foi a adição de 50 µL de substrato enzimático (3.25 mL de ácido cítrico 0.1M, 3.5 mL de fosfato de sódio 0.2M, 5 µL de água oxigenada 30V e 5.75 mL de água destilada), acrescidos de 5 µg de ortofenildiamina (OPD- Sigma, EUA), incubados por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N, sendo a placa lida em espectrofotômetro a 492nm.

#### 4.8 – Análises estatísticas

A escolha das amostras de IgY anti-*B. abortus* e IgY anti-LPS utilizadas para os ELISAc exigiu que fossem feitas análises estatísticas dos dados encontrados. A escolha que fizemos estatisticamente entre as médias e se os fatores exerciam influência em alguma variável dependente exigiu que, para este fim, utilizássemos o Teste de ANOVA (Analysis of variance).

A aplicação da ANOVA foi feita para comparar os diferentes tratamentos diante dos diferentes grupos analisados, que foram, neste caso, os diferentes períodos de imunização por animal e os diferentes animais com mesmo antígeno.

Outra análise que fizemos foi em relação aos ensaios oriundos dos resultados obtidos a partir dos ELISAs competitivos frente aos antígenos LPS e *Brucella abortus*.

Tais análises foram avaliadas com o uso de TW-ROC (Two-Way Receiver Operating Characteristic) (Greiner et al., 1995), responsável pelo procedimento do ponto de corte a ser utilizado e, portanto, da padronização final dos ELISAs competitivos com os diferentes antígenos.

## 5 - Resultados

### 5.1 – Análises dos soros das poedeiras frente às diferentes etapas de imunizações

As análises dos soros de todos os animais imunizados foram realizadas após a terceira e a quinta imunização. Os resultados da última avaliação podem ser averiguados na Figura 2.

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,575	0,709	0,628	0,523	2,458	2,709	2,569	2,856	2,72	2,776	2,67	1,795
B	0,333	0,473	0,344	0,25	2,475	2,638	2,552	2,798	2,787	2,745	2,715	2,662
C	0,205	0,401	0,138	0,173	2,349	2,559	2,485	2,839	2,426	2,514	2,675	2,633
D	0,866	0,262	0,107	0,082	1,576	2,453	2,357	2,617	1,511	1,672	2,625	2,603
E	0,522	0,205	0,14	0,064	1,658	2,072	2,156	2,297	0,785	0,887	2,154	1,656
F	0,23	0,143	0,11	0,086	1,337	1,416	1,592	1,637	0,448	0,498	1,42	1,054
G	0,182	0,095	0,071	0,049	0,816	0,721	0,977	1	0,291	0,286	0,749	0,566
H	0,28	0,148	0,132	0,069	0,683	0,593	0,696	0,763	0,152	0,176	0,468	0,285
	LPS 1		LPS 2		Brucella 1		Brucella 2		IgG 1		IgG 2	

Figura 2: Absorbâncias encontradas após ELISAI (ELISA indireto) contra os soros das aves relacionados à última imunização demonstrando uma formatação condicional gradativa de cores vermelha a amarela, cuja tonalidade da cor representa o valor da célula. Abaixo, encontra-se um quadro relativo ao animal imunizado.

Observou-se uma grande variação nas respostas sorológicas condizentes à imunização contra o antígeno LPS, nos diferentes animais utilizados, e também em comparação aos outros que, como observamos na figura supracitada, se manteve até a última imunização.

Os outros dois antígenos utilizados neste trabalho, *B. abortus* 1119-3 e IgG bovino, estimularam boa resposta imunológica em todos os animais utilizados a partir do segundo inóculo (dados não mostrados).

## 5.2 – Análises dos extraídos das gemas frente às diferentes etapas de imunizações e antígenos

As amostras dos extraídos de todos os animais imunizados estão demonstradas, abaixo, nas Figuras 3, 4 e 5. Os valores apresentados nas figuras são as médias aritméticas das absorbâncias encontradas frente às diluições seriadas, feitas sob base 3, e começando com a diluição do extraído de 1:500 e indo até 1:1093500.

A Figura 3 detalha a resposta das imunizações, utilizando o antígeno LPS, em ensaios imunoenzimáticos, sensibilizado com LPS e com proteínas brucélicas obtidas a partir da *B. abortus* 1119-3.

A									
0,2005	0,164	0,204	1,001	0,8625	0,8325	2,3545	2,186	2,297	2,2565
0,098	0,112	0,1245	0,586	0,5605	0,5175	2,005	1,775	1,738	1,5855
0,083	0,119	0,0895	0,3275	0,272	0,3175	1,598	1,1115	1,0695	0,8375
0,0855	0,1205	0,095	0,1585	0,1905	0,1865	0,883	0,525	0,4955	0,409
0,089	0,071	0,076	0,0935	0,094	0,1095	0,398	0,2515	0,245	0,211
0,0925	0,0945	0,1635	0,0835	0,2725	0,221	0,198	0,1445	0,146	0,138
0,0775	0,3415	0,2195	0,2425	0,1425	0,085	0,1215	0,102	0,104	0,106
0,0895	0,102	0,0895	0,1695	0,101	0,0895	0,0985	0,0895	0,0895	0,09
C-/A2	A53	A54	A56	A59	A60	A51	A44	A46	A48

B									
0,0895	0,0995	0,1185	0,429	0,421	0,562	1,039	0,761	0,696	0,5735
0,076	0,079	0,08	0,206	0,2615	0,288	0,6025	0,3985	0,4935	0,347
0,055	0,065	0,0635	0,146	0,191	0,1585	0,4925	0,251	0,3465	0,1985
0,0525	0,1035	0,065	0,112	0,1135	0,1025	0,222	0,2835	0,1965	0,1365
0,056	0,053	0,0675	0,074	0,113	0,086	0,144	0,113	0,1225	0,1185
0,082	0,0765	0,0545	0,0605	0,0715	0,0955	0,1055	0,094	0,105	0,0975
0,0875	0,084	0,1345	0,123	0,0885	0,0745	0,0945	0,0905	0,0905	0,0855
0,102	0,1145	0,1405	0,098	0,0715	0,0705	0,089	0,087	0,084	0,0875
C-/A2	A53	A54	A56	A59	A60	A51	A44	A46	A48

Figura 3: Médias aritméticas das absorbâncias, encontradas por extraído, sob uma formatação condicional gradativa de cores vermelha a amarela, por período de imunização crescente com o antígeno LPS.

A Figura 3(A) relaciona a resposta das imunoglobulinas Y anti-LPS ao uso do próprio LPS para sensibilizar a placa, e a Figura 3(B) relaciona a resposta das imunoglobulinas Y anti-LPS ao uso do extrato proteico de *B.*

*abortus* 1119-3 para sensibilizar a placa. Estes dados são referentes ao animal LPS -1.

As avaliações das respostas imunológicas das imunoglobulinas Y anti-LPS revelaram a manutenção do padrão apresentado pelos soros. Porém, após a última imunização, os extraídos apresentaram boas absorvâncias a ponto de poderem ser usados nos ensaios imunoenzimáticos.

A Figura 4 detalha as respostas das imunizações do antígeno extrato proteico de *B. abortus* 1119-3, em ensaios imunoenzimáticos, sensibilizado com LPS e com proteínas brucélicas obtidas a partir da *B. abortus* 1911-3.

A									
0,0565	1,5175	1,5715	1,6905	1,7705	1,8835	1,782	1,6235	1,7675	1,767
0,0525	1,311	1,442	1,6745	1,7165	1,792	1,716	1,787	1,694	1,669
0,0505	1,207	1,319	1,2785	1,345	1,5485	1,699	1,611	1,687	1,5065
0,0545	0,794	0,9245	0,843	0,9285	1,194	1,3105	1,0165	1,2475	1,0215
0,0465	0,4365	0,3985	0,419	0,4195	0,647	0,8185	0,4755	0,708	0,4165
0,0495	0,2065	0,211	0,209	0,2015	0,252	0,399	0,2295	0,3955	0,265
0,0475	0,1035	0,111	0,0965	0,1275	0,1765	0,205	0,1155	0,166	0,119
0,0495	0,0725	0,106	0,064	0,0745	0,095	0,112	0,0775	0,1025	0,08
A3/C-	A16	A20	A22	A29	A7	A12	A33	A39	A42
B									
0,1195	1,5825	1,4975	1,562	1,575	1,6375	1,7235	1,879	1,736	1,666
0,0795	1,277	1,178	1,312	1,3605	1,4225	1,6705	1,5535	1,7035	1,6895
0,065	0,8795	0,8415	0,9285	0,9375	1,0885	1,5585	1,278	1,455	1,3135
0,0545	0,512	0,5835	0,4235	0,485	0,836	1,053	0,811	0,895	0,81
0,0465	0,276	0,243	0,233	0,2485	0,387	0,7125	0,393	0,6405	0,3935
0,0445	0,1315	0,136	0,1385	0,142	0,162	0,3635	0,183	0,29	0,203
0,0455	0,0835	0,1185	0,074	0,0785	0,0985	0,176	0,1075	0,1395	0,1055
0,052	0,064	0,0595	0,0615	0,0635	0,0695	0,1025	0,07	0,085	0,0735
A3/C-	A16	A20	A22	A29	A7	A12	A33	A39	A42

Figura 4: Médias aritméticas das absorvâncias, encontradas por extraído, sob uma formatação condicional gradativa de cores vermelha a amarela, por período de imunização crescente com o antígeno extrato proteico de *B. abortus* 1119-3.

A Figura 4(A) relaciona a resposta do IgY anti-*Brucella* ao uso do LPS para sensibilizar a placa, e a Figura 4(B) relaciona a resposta do IgY anti-*Brucella* ao uso do extrato proteico de *B. abortus* 1119-3 para sensibilizar a placa. Estes dados são referentes ao animal *Brucella*-1.

Os padrões de resposta, frente ao antígeno acima citado, foram altos desde a primeira imunização e não apresentaram grandes variações frente aos diferentes animais utilizados. Apresentaram ponto de corte médio de 1:4000.

0,2325	0,869	0,8605	1,063	1,0615	1,089	0,9985	1,0315	1,032
0,113	0,3745	0,4615	0,8705	0,7715	0,847	0,9035	0,8885	0,8875
0,073	0,216	0,3805	0,7285	0,542	0,7055	0,714	0,7275	0,7095
0,0575	0,121	0,2375	0,3695	0,4475	0,451	0,5295	0,562	0,4635
0,0485	0,072	0,1305	0,2175	0,1885	0,2375	0,29	0,316	0,2755
0,054	0,0605	0,0925	0,113	0,1865	0,1555	0,165	0,1665	0,1485
0,054	0,0515	0,108	0,074	0,073	0,0885	0,099	0,0985	0,089
0,066	0,0625	0,138	0,158	0,068	0,079	0,075	0,0725	0,0775
A43/C-	A13	A19	A25	A27	A8	A11	A35	A38



Figura 5: Médias aritméticas das absorvâncias encontradas, por extraído, sob uma formatação condicional gradativa de cores vermelha a amarela, por período de imunização crescente com o antígeno IgG bovino. Estes dados são referentes ao animal IgG-2.

Os padrões de resposta dos animais que foram imunizados com IgG bovino foram altos, mas não tanto quanto aos encontrados com os outros antígenos utilizados, e não apresentaram grandes variações frente aos diferentes animais utilizados. Apresentaram ponto de corte médio de 1:2000.

### 5.3 – Análise das proteínas brucélicas utilizadas no sorodiagnóstico e na imunização

A preparação da *Brucella abortus* 1119-3, para imunização e sorodiagnóstico, após rompimento físico, por sonicação e térmico das células bacterianas, gerou dados a serem avaliados.

A avaliação dos extraídos basearam-se na análise de géis SDS-PAGE e na análise das áreas relativas encontradas frente ao peso molecular, como pode ser verificado na Figura 6.

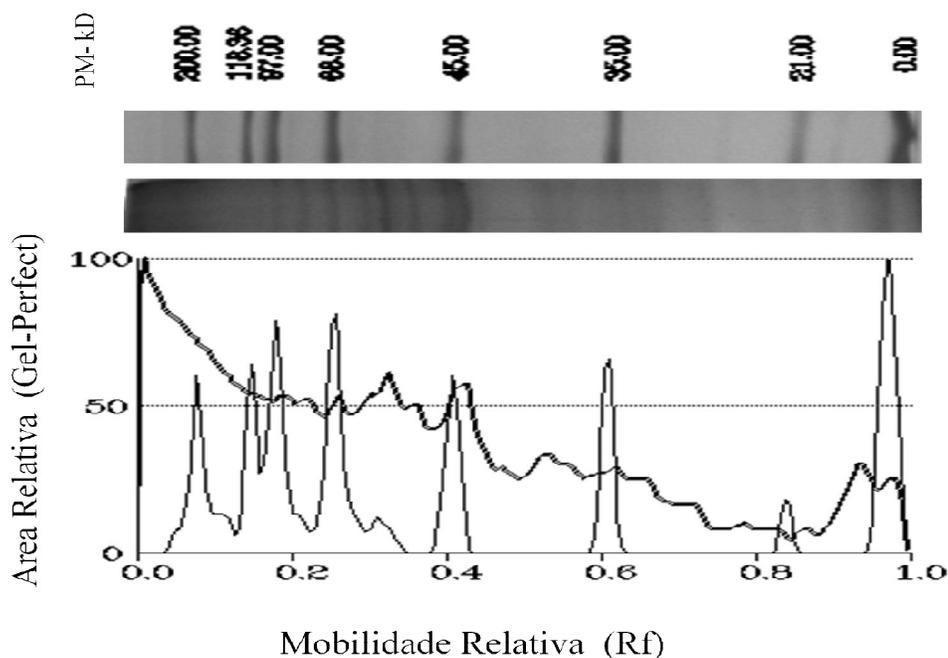


Figura 6: Perfil proteico encontrado da *B. abortus* 1119-3 após rompimento físico e térmico, demonstrando áreas relativas das mesmas frente ao peso molecular.

As etapas de verificação do perfil proteico, após o rompimento das células bacterianas, estabeleceram e padronizaram as amostras utilizadas para o grupo a ser imunizado com o mesmo, fato este de suma importância para manter um padrão de resposta, já que foram trabalhadas diferentes imunizações.

#### **5.4 – Avaliação das extrações, purificações e quantificações proteicas das gemas**

Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos aos antígenos utilizados, em contraste aos animais utilizados como controle negativo.

Na Figura 7, são exemplos, diante dos muitos ensaios de extração realizados, das quantificações relativas resultantes das extrações das gemas. Como mostra esta figura, e corrobora a Figura 8 e o Quadro 1, os extraídos apresentaram altas concentrações proteicas e limpidez como mostradas pela técnica de SDS-PAGE.

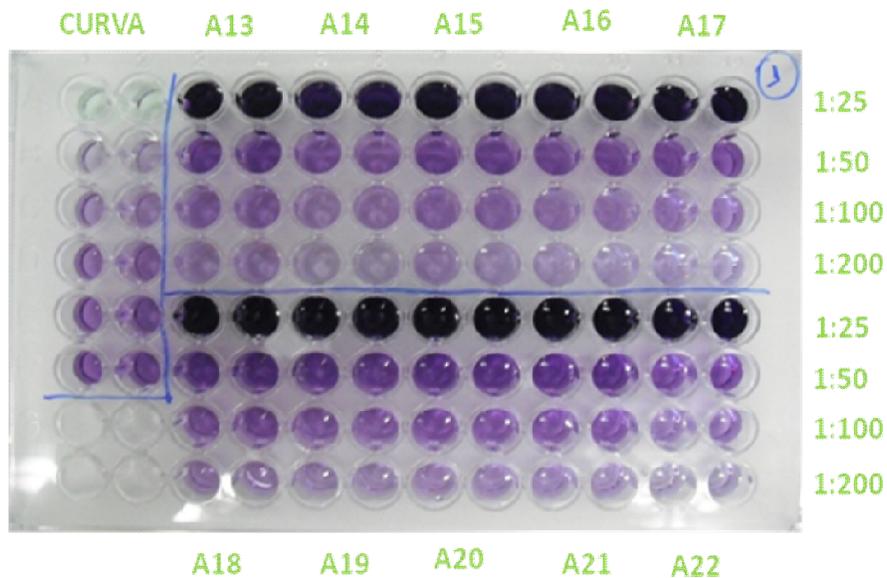


Figura 7: Exemplos de Quantificação de Proteínas das amostras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

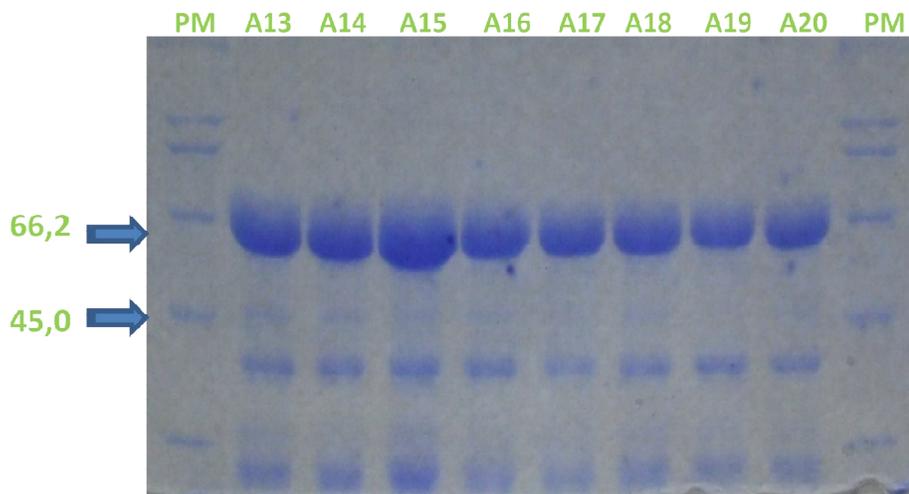


Figura 8: Exemplo de perfis eletroforéticos dos extraídos proteicos a partir das gemas, nas análises realizadas em gel SDS-PAGE das amostras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20.

Amostras (A)  Período	LPS				Brucella abortus				IgG bovino			
	LPS 1		LPS 2		Brucella 1		Brucella 2		IgG 1		IgG2	
	A	[ ]	A	[ ]	A	[ ]	A	[ ]	A	[ ]	A	[ ]
Controle	A2	718.32	A3	802.43	A4	772.23	A49	361.92	A1	678,72	A43	266,6
13 a 16/01/10	A54	393.2	A55	417.16	A20	846.95	A21	817.62	A18	795,59	A13	736,02
7 a 9/02/10	A56	552.66	A57	547.01	A22	673.33	A23	720.95	A24	773,2	A19	692,3
10 a 13/02/10	A59	483.82	A58	532.99	A29	633.38	A30	629.64	A26	850,14	A25	882,3
14 a 16/02/10	A60	441.91	A61	364.39	A7	740.77	A6	893.07	A9	627,1	A27	949,85
17 a 20/2/10	A51	437.5	A52	552.90	A12	1046.9	A10	799.68	A28	741,16	A8	839,4
22 a 23/02/10	A44	425.04	A45	435.49	A33	749.52	A32	457.72	A34	747,1	A11	98,04
3 a 6/3/10	A46	603.52	A50	492.25	A39	848.11	A40	804.57	A36	621,29	A35	790,3
14 a 16/3/10	A48	403.11	A47	472.99	A42	449.63	A41	832.52	A37	574,9	A38	683,35

Quadro 1: Resultados de algumas quantificações (em  $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ) de amostras (A), após extrações e purificações proteicas das gemas relativas aos diferentes antígenos.

### 5.5 – Perfil de resposta dos animais imunizados com os antígenos utilizados, LPS, *B. abortus* 1119-3 e IgG bovino.

Para determinar o potencial diagnóstico dos IgYs frente aos diferentes antígenos, foi testada sua habilidade para reconhecer os antígenos utilizados neste trabalho.

A reatividade primeiramente testada foi a relativa ao grupo de animais imunizados com LPS, detalhadas nas Figuras 9 e 10. Após analisar o grupo de animais imunizados com LPS, nota-se que a reatividade variou um pouco e as amostras demoraram a apresentar altas frequências de positividade, ao passo que o grupo imunizado com extrato proteico de *Brucella* apresentou altas frequências de positividade logo após as primeiras imunizações. Como demonstrado nas Figuras 11 e 12.

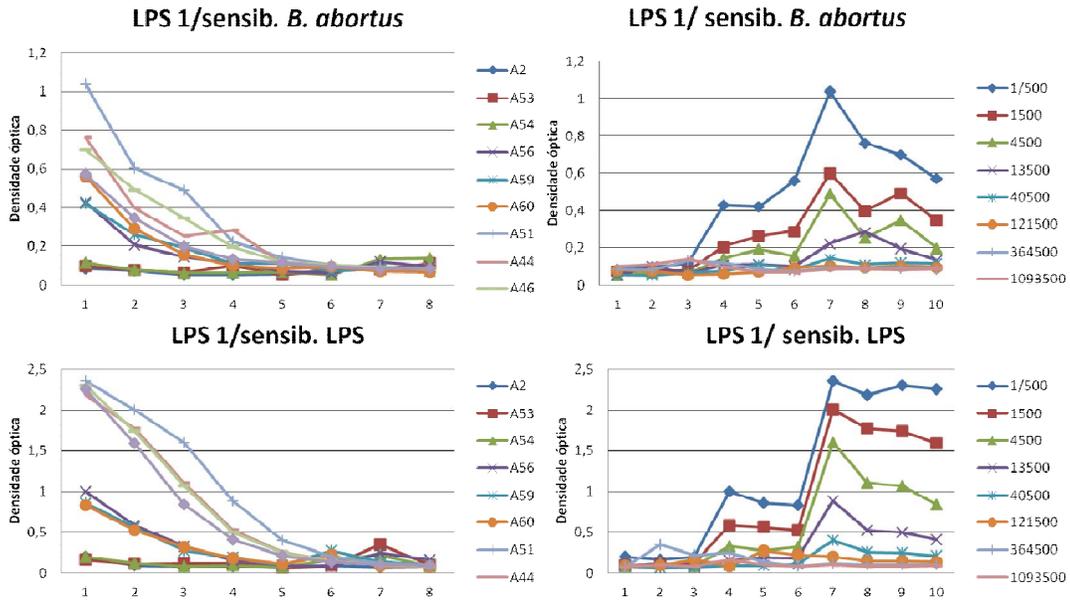


Figura 9: Perfil de resposta do animal imunizado com LPS (animal LPS 1).

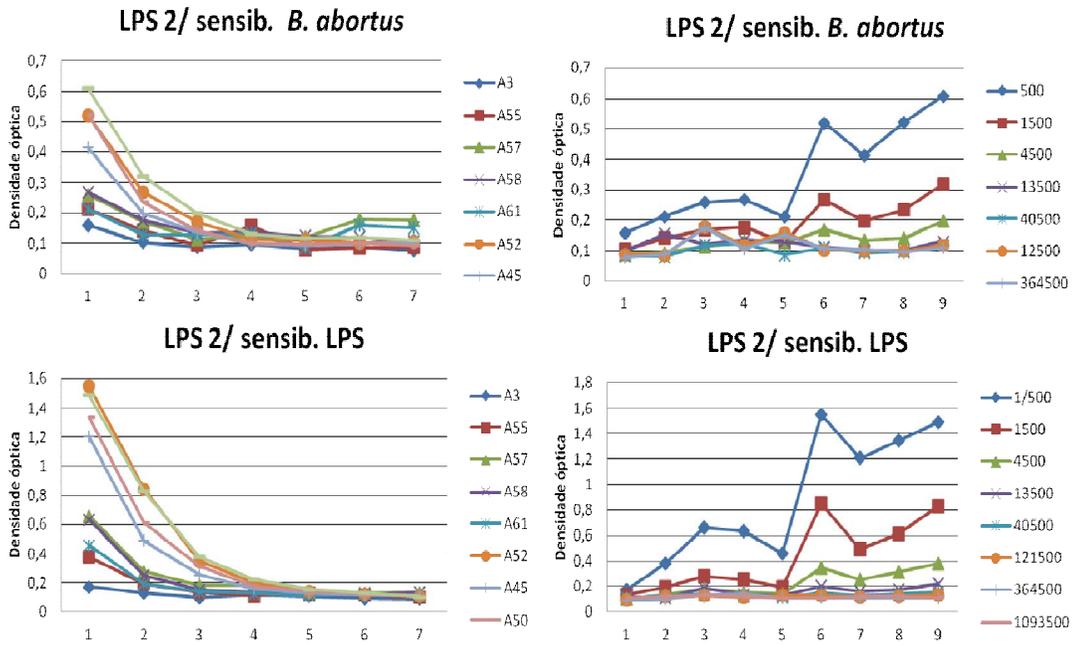


Figura 10: Perfil de resposta do animal imunizado com LPS (animal LPS 2).

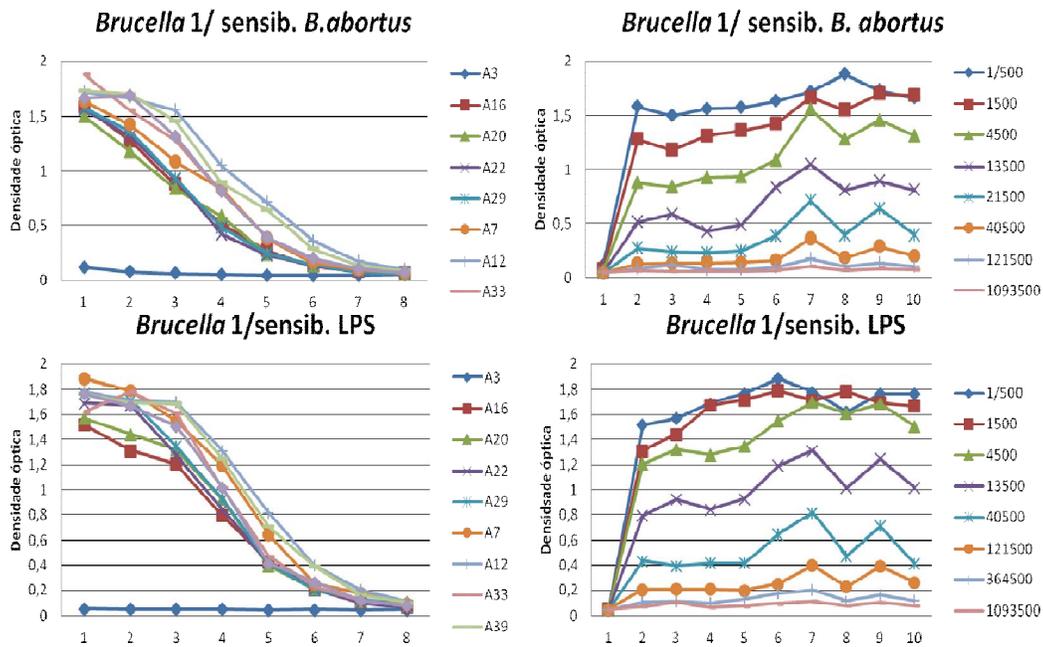


Figura 11: Perfil de resposta do animal imunizado com extrato proteico de *B. abortus* 1119-3 (animal *Brucella* 1).

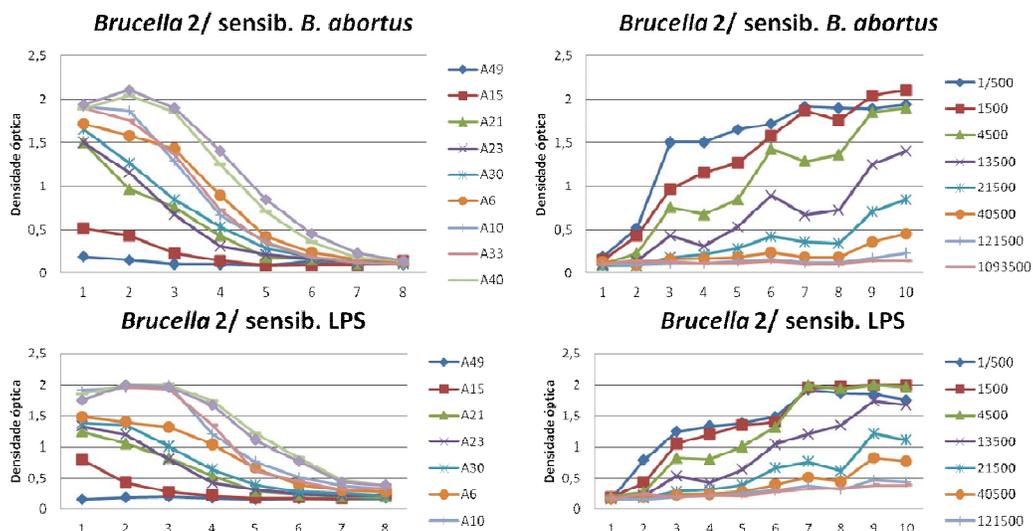


Figura 12: Perfil de resposta do animal imunizado com extrato proteico de *B. abortus* 1119-3 (animal *Brucella* 2).

Analisando os perfis de resposta de cada animal no grupo imunizado com IgG bovino, é possível visualizar que o índice de reatividade é crescente para

este antígeno (Figura 13) e também que há uma manutenção dos padrões de resposta após semanas da última imunização.

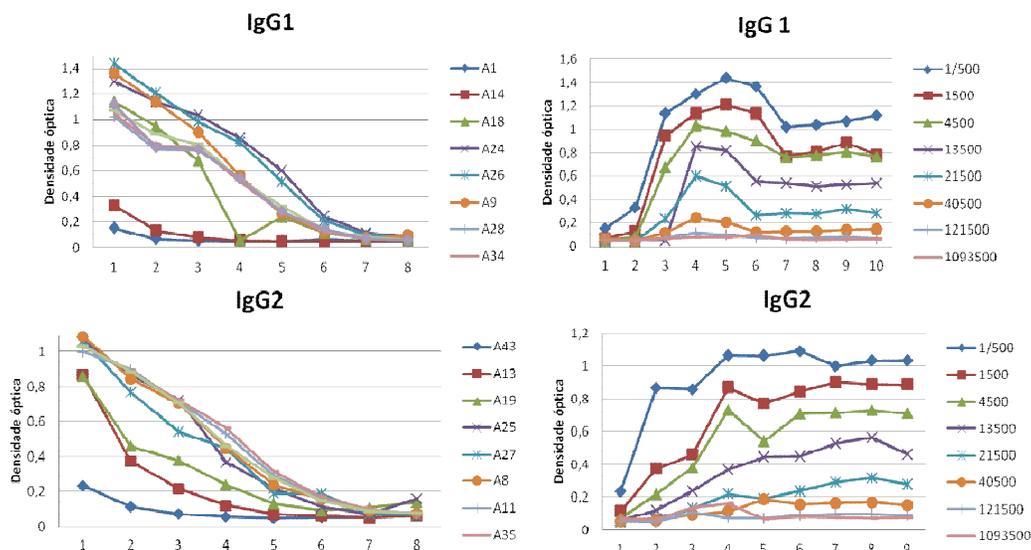


Figura 12: Perfil de resposta dos animais imunizados com IgG bovina (animal IgG 1 e 2).

## 5.6 - Análise estatística relacionada à escolha das IgY a serem utilizadas nos ELISAs competitivos (ELISAc) para padronização

O teste de ANOVA comparou diferentes tratamentos diante dos diferentes grupos analisados que, neste caso, foram os diferentes períodos de imunização entre o número (N) de animais por antígeno.

A análise de variância das imunoglobulinas Y anti-LPS demonstrou que a amostra A51 oriunda do animal LPS 1 apresentou uma diferença significativa entre os tratamentos e grupos analisados.

Assim como dentre as imunoglobulinas Y anti-*B. abortus* 1119-3, a amostra A39 oriunda do animal *Brucella* 1 foi mais significativa dentre os tratamentos e grupos analisados.

Diante do exposto, este resultado estabeleceu que as amostras A51 e A39 seriam biotiniladas, com a finalidade de uso na padronização do ensaio imunoenzimático frente aos soros bovinos do controle.

### 5.7 - ELISAs competitivos (ELISAc) seus respectivos testes estatísticos

Os resultados do ELISAc, quanto à sua porcentagem de positividade relativa (%P), utilizando a fórmula (1), serão demonstrados nas Figuras 13 e 15; enquanto os da Porcentagem de Inibição relativa (%I), utilizando a fórmula (2), serão demonstrados nas Figuras 14 e 16.

$$\%P = \frac{\text{Densidade óptica}_{\text{amostra}}}{\text{Densidade óptica}_{\text{controle positivo}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%I = 100 - \frac{\text{Densidade óptica}_{\text{amostra}}}{\text{Densidade óptica}_{\text{controle negativo}}} \times 100 \quad (2)$$

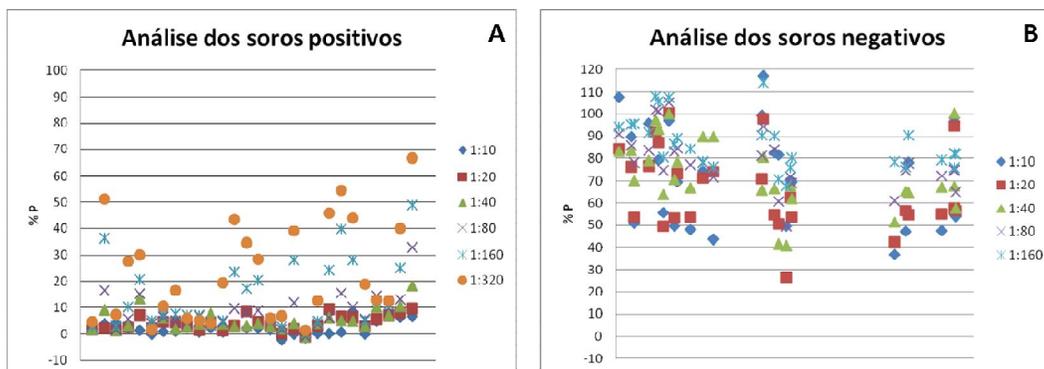


Figura 13: Demonstração da distribuição da Porcentagem de Positividade Relativa (%P), comparando as análises dos soros bovinos positivos (A) e negativos (B), utilizando IgY anti-LPS para o estudo.

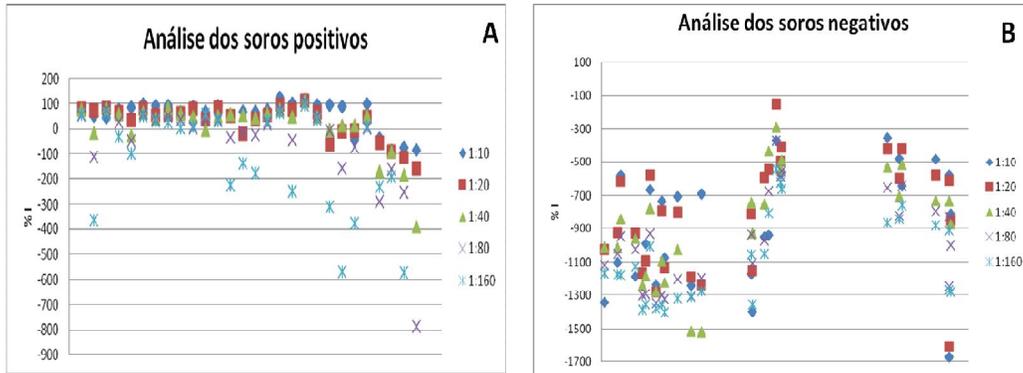


Figura 14: Demonstração da distribuição da Porcentagem de Inibição Relativa (%I), comparando as análises dos soros bovinos positivos (A) e negativos (B), utilizando IgY anti-LPS para o estudo.

Os resultados da utilização de IgY anti-LPS, para a padronização do ELISAc, demonstraram que os testes de Porcentagem de Positividade Relativa (%P) e Porcentagem de Inibição Relativa (%I) apresentaram alta correlação, principalmente diante das diluições de IgY de 1:10 a 1:80 (Anexo 2).

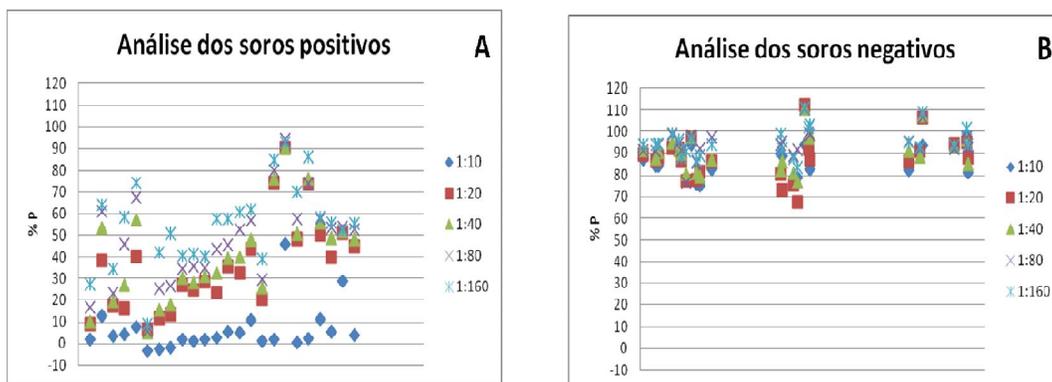
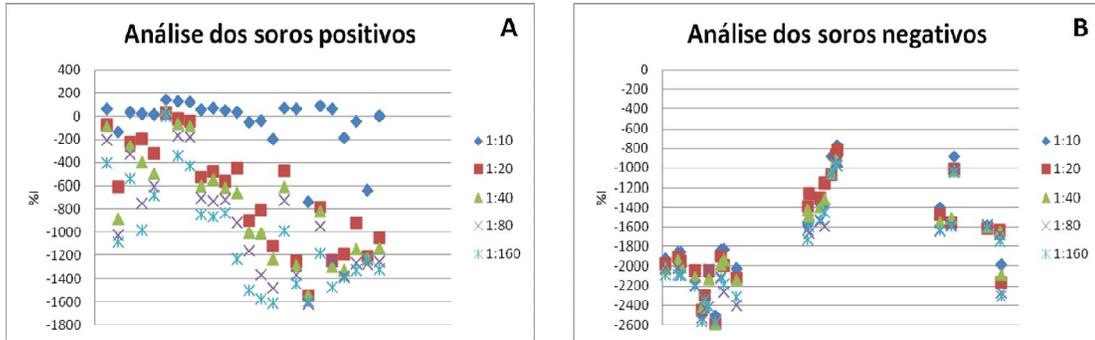


Figura 15: Demonstração da distribuição da Porcentagem de Positividade Relativa (%P), comparando as análises dos soros bovinos positivos (A) e negativos (B), utilizando IgY anti-*Brucella* para o estudo.



**Figura 16:** Demonstração da distribuição da Porcentagem de Inibição relativa (%I) comparando as análises dos soros bovinos positivos (A) e negativos (B) utilizando IgY anti-*Brucella* para o estudo.

## 6 – Discussão

Neste estudo, foram utilizadas galinhas poedeiras da linhagem Hysex Brown para a produção de anticorpos IgY policlonais anti-*Brucella*, LPS e IgG bovino. Anteriormente, Ma e Zhang (2010) imunizaram galinhas com lipopolissacarídeo emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (AIF) e realizaram a extração dos anticorpos com IgY por meio de água acidificada e sulfato de sódio, e obtiveram 8,5 mg/mL. Lee et al. (2002) inocularam galinhas com suspensões de bactérias Gram negativas, *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium*, diluídas em AIF, recuperando aproximadamente 7 mg de anticorpos total/mL de gema. Portanto, os valores encontrados, neste estudo, de 7,5 mg/mL, corroboram os outros autores que utilizaram procedimentos semelhantes.

Normalmente, a imunização de galinhas pela via intramuscular, com antígenos proteicos e AIF, é utilizada para a indução de anticorpos IgY policlonais (Schade et al., 1996; Parma et al., 2011; Qu et al., 2011; Wen et al., 2012). Entretanto, as reações inflamatórias locais são uma preocupação, embora nem sempre sejam observadas em galinhas. Entretanto, um efeito colateral frequente em galinhas é a queda transitória na produção de ovos durante o período de imunizações (Hatta et al., 1993; Chalghoumi et al., 2008). No presente estudo, as inoculações realizadas não resultaram em queda da produção de ovos além das expectativas.

As maiores concentrações de anticorpos IgY específicos, em determinados períodos após imunizações, permitem racionalizar as coletas e os procedimentos de purificação (Schade, 2005; Chalghoumi et al., 2008). Os resultados da concentração proteica média das amostras de IgY, obtidas após precipitação com sulfato de sódio, dos três grupos (LPS, *B. abortus* 1119-3 e IgG bovino), não foram semelhantes entre si, além de variarem dentro do grupo. Porém, os antígenos *B. abortus* 1119-3 e IgG bovino mantiveram níveis estáveis após o primeiro *booster* até o final do experimento.

A detecção de anticorpos IgY na gema ocorre com um atraso de aproximadamente 7 dias, depois da detecção sérica dos anticorpos. Este fenômeno ocorre devido ao tempo requerido para o desenvolvimento do folículo ovariano e ovopostura (Davison, Magor e Kaspers, 2008). Por outro lado, os anticorpos IgY podem desenvolver, precocemente, a maturação da avidéz, logo após a resposta imune primária (Wolley e Landon, 1995). No presente estudo, as quantidades de anticorpos IgY anti-LPS estimadas por meio do índice ELISA (IE), foram detectadas a partir do 59º dia, para LPS 1; e 61º dia, para LPS 2; 26º dia, para *Brucella* 1; 24º dia, para *Brucella* 2; 41º dia, para IgG1 e 2. E, após estes períodos, tais quantidades foram crescentes ao longo do protocolo de imunização, com exceção em relação aos animais imunizados com LPS, que tiveram uma leve queda.

A detecção dos antígenos de *B. abortus* ou LPS, por meio de anticorpos específicos de mamíferos, é um critério para determinar a exposição do hospedeiro a este patógeno. No presente estudo, demonstrou-se que os anticorpos de galinhas imunizados com os perfis acima expostos reconhecem os antígenos a tal ponto de ter sua sensibilidade e especificidade comparadas às dos testes comerciais presentes no Brasil para *B. abortus*.

Os resultados observados nos ELISAs indiretos mostraram que a resposta humoral foi mais intensa nos grupos imunizados com extrato proteico de *B. abortus* 1119-3 e LPS, apesar de este último apresentar uma resposta tardia ao estímulo oferecido. Porém todos os grupos tratados com os diferentes antígenos mostraram um decaimento mínimo ao estímulo antigênico, mesmo após 4 semanas da última imunização.

Imunoglobulinas Y policlonais têm-se mostrado eficientes em estudos associados a fatores de virulência bacterianos (Parma et al., 2011), porque as IgY apresentam resistência ao pH ácido ou à inativação proteolítica, desde que preparadas para esse fim (Schade, 2005; Kovacs-Nolan e Mine, 2012). Essa característica abre a possibilidade de usar tal imunoglobulina em pesquisas com patógenos que possuem as vias mucosas como principal porta de entrada nos hospedeiros (Liou et al., 2010; Veja et al., 2011; Wen et al., 2012; Kovacs-Nolan e Mine, 2012).

Neste trabalho, os antígenos LPS e extrato Brucélico demonstraram ser potenciais candidatos na validação de testes imunológicos contra *Brucella abortus*, visto que ambos foram capazes de estimular a resposta humoral em galinhas ao ponto de reproduzirem anticorpos com especificidade relativa em níveis semelhantes aos liberados para uso no mercado brasileiro.

## 7- Conclusões

O protocolo de imunização empregado frente aos diferentes antígenos utilizados, LPS, *Brucella abortus* 1119-3 e IgG-bovino, mostrou-se adequado, já que foi capaz de induzir IgY em concentrações e especificidade adequadas.

O fato de as análises da Porcentagem de Inibição Relativa (%I) e Positividade Relativa (%P), resultantes do ELISAc, apresentarem as sensibilidade e especificidade adequadas somente contribuem para o uso do IgY, como uma ferramenta em testes imunológicos para *Brucella*, já que se equipara às alternativas existentes preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).

**2 - Capítulo 2: Quantificação da expressão de genes de virulência, diretos e indiretos, regulados pelo Sistema de dois componentes BvrR/BvrS em *Brucella***

## 2.1 – Introdução

### 2.1.1 – *Brucella*

Antigenicamente, as brucelas são divididas em dois grupos distintos: as lisas ou clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas ou não clássicas (*B. ovis*, *B. canis* e *B. maris*). *B. abortus* subdivide-se em 8 biotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19); a *B. melitensis* em 3 (1, 2 e 3); e a *B. suis* em 5 (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, apesar de apresentarem variantes, não se subdividem em biotipos (Corbel, 1997).

Mundialmente, as principais espécies patogênicas para os animais domésticos são a *B. abortus*, responsável pela brucelose bovina; *B. melitensis*, agente etiológico da brucelose em caprinos e ovinos; e a *B. suis*, responsável pela brucelose suína (Godfroid et al., 2005).

Embora exista predileção por espécies animais que infectam, não existe especificidade quanto a este sentido, podendo inclusive as brucelas serem isoladas de animais silvestres, considerados reservatórios zoonótico da brucelose (Godfroid, 2002).

O gênero *Brucella* possui, como características taxonômicas, cocobacilos ou bacilos curtos, Gram negativos, imóveis e não possuem flagelos com 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,6 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento, dispostos aos pares e, menos frequentemente, em pequenos grupos. A morfologia da *Brucella* spp. é normalmente constante, exceto em culturas antigas, cujas formas são pleomórficas. (Corbel, 1997).

A brucelose possui características peculiares que a diferencia de outras enfermidades infectocontagiosas. Dentre estas características, está uma série de fatores dependentes da *Brucella* spp. e do hospedeiro, que influem na evolução da enfermidade, com importantes repercussões no estado sanitário do rebanho e, portanto, importante na epidemiologia da enfermidade (León, 1994).

### 2.1.2 – Patogenia

A *Brucella* é um microrganismo de localização e multiplicação intracelular facultativa, podendo se multiplicar no interior de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares após sua fagocitose. No interior dos polimorfonucleares, este microrganismo pode sobreviver durante prolongado período de tempo, existindo a possibilidade de que a evolução da enfermidade dependa da capacidade bactericida destas células (León, 1994).

O gênero não possui fatores de virulência clássicos, como endotoxinas e exotoxinas, e exibe tendência a invadir e persistir no hospedeiro mediante a inibição da morte celular programada (Detilleux et al., 1991).

As brucelas ingressam no hospedeiro pelas mucosas dos tratos digestivo, genital, respiratório e pelas mucosas conjuntivas, ou então por soluções de continuidade da pele. Então, são carregadas até os linfonodos e fagocitadas, principalmente por macrófagos, local onde podem permanecer quiescentes por meses (Arenas et al., 2000).

Após a fagocitose, a maioria das brucelas é eliminada pela fusão fagolisossomal, somente de 15 a 30% sobrevivem, por estarem envoltas por compartimentos acidificados (Arenas et al., 2000). A formação deste ambiente não está completamente elucidada, porém se sabe que este é responsável por limitar a ação de antibióticos e por explicar a discrepância entre estudos *in vitro* e *in vivo* (Pizarro-Cerda et al., 1998).

A multiplicação da bactéria acontece no retículo endoplasmático sem afetar a integridade da célula hospedeira. Após a multiplicação, o microrganismo é liberado pela ação de hemolisinas e indução de necrose celular (Gorvel e Moreno, 2002).

Através da corrente circulatória, as bactérias chegam aos órgãos de predileção (baço, fígado, linfonodos), ou seja, naqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para o seu metabolismo. Destacam-se os produtos da degradação dos hormônios esteroides, a Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2 α</sub>) e o Estradiol - 17β (E17 β), além de outras progestinas (Quinn et al.,

1994). Acredita-se que os produtos da degradação desses hormônios sejam talvez utilizados no metabolismo das brucelas, que colonizam e multiplicam-se dentro dos trofoblastos (Meador e Deyoe, 1989).

O eritrol é outro metabólito que merece destaque na patogenia da brucelose. Ele está presente no útero gravídico, tecidos mamários e osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutivo masculino, como: testículo, epidídimo e vesícula seminal (OMS, 1986). A oferta de eritrol cresce em razão direta da evolução da gestação até os 5 meses de gestação, quando ocorre o pico de concentração (Samartino et al., 1996).

A multiplicação da *Brucella* no ambiente uterino desencadeia uma reação inflamatória dos placentomas que evolui para necrose, lise das vilosidades e, subsequente, deslocamento do cotilédone e da carúncula. Nos cursos agudos, esse processo desencadeia o abortamento. Porém, quanto menos intensa for a necrose, maior será a deposição de fibrina entre as vilosidades e mais tardio o abortamento, podendo a gestação vir a termo, gerando produtos que sobrevivem poucos dias. Excesso de retenção de fibrina leva à retenção de placenta. As lesões também diminuem a circulação materno-fetal, comprometendo a respiração e a alimentação do produto, levando-o à morte, que também pode ser causada pelas próprias bactérias, caso estejam em concentração elevada no âmnion. O quadro pode evoluir para metrite ou endometrite crônicas, gerando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade, em geral apresentando secreção vaginal (Paulin, 2006).

Cerca de 2 semanas após a expulsão do produto, quando o útero entra em repouso e a bactéria migra para outros órgãos ativos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, pode ocorrer mastite crônica sem lesões aparentes ou mudanças das características do leite (Batheke, 1988).

A bactéria é eliminada em grandes quantidades pelo animal infectado, pelos produtos do abortamento ou parto e pela secreção vaginal durante todo o puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de novos animais. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e persiste por meses (Acha e Szyfres, 2003).

Na infecção aguda de brucelose, é esperado que as brucelas distribuídas, por via hematogênica, estejam presentes em todos os órgãos das fêmeas (Gallien et al., 1998). Em ruminantes, não há imunidade transferida da mãe para o feto através da placenta, mas pelo colostro após o nascimento, sendo que as moléculas intactas de imunoglobulinas são absorvidas pela parede do trato gastrointestinal apenas até as primeiras 36 horas de vida (Paulin, 2001). Neste momento, animais infectados acabam comprometendo o recém-nato.

## **2.2 - Vida intracelular da *Brucella* spp.**

### **2.2.1 – Internalização da *Brucella* spp.**

Durante o ciclo de infecção em humanos e animais, a *Brucella* utiliza fagócitos profissionais e não profissionais, como as células hospedeiras. *B. abortus* é capaz de invadir um amplo número de linhagens celulares, tais como: os fibroblasto murinos NIH3T3, células Vero, Células HeLa, células Madin-Darby de bovino (MDBK) e células BHK (Chaves-Olarte et al., 2002; Moreno & Gorvel, 2004; Pizarro-Cerdá et al., 2000).

*In vivo*, *Brucella* foi encontrada em fibroblastos bovinos, caprinos e murinos, em linfócitos caprinos, células M, fibroblastos de embrião de galinhas; e em um grande número de fagócitos profissionais de diferentes tecidos (Moreno & Gorvel, 2004).

Uma vez que a *Brucella* invade a mucosa, os fagócitos profissionais que se encontram abaixo da submucosa englobam a bactéria. Há relato em que as células M, macrófagos e neutrófilos também ingerem a bactéria mediante fagocitose tipo zíper (Ackermann et al., 1988; Gorvel e Moreno, 2002).

*B. abortus* é capaz de penetrar nas células hospedeiras mediante a indução de um reordenamento local da membrana plasmática. O tratamento de

células hospedeiras com substâncias que inibem a polimerização de microtúbulos (nocodazol) e os filamentos de actina (citocalasina D) altera a internalização da bactéria (Gorvel & Moreno, 2002; Guzmán-Verri et al., 2001; Pizarro-Cerdá et al., 2000).

A ativação de GTPases da subfamília Rho como Rho, Rac e Cdc42 são requeridas para a internalização da *Brucella* em fagócitos não profissionais (Chaves-Olarte et al., 2002; Guzmán-Verri et al., 2001).

Foi demonstrado que *B. abortus* evade da degradação intracelular por meio da dissociação da cascata endocítica/fagocítica. A *B. abortus* pode se internalizada nas células hospedeiras 5 minutos depois de ser inoculada em uma monocamada celular (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 2000).

### **2.2.2 - Interação com a via endossomal inicial**

Durante os primeiros minutos, tanto *B. abortus* como a cepa atenuada S19 interagem com os compartimentos intracelulares relacionados com a via endossomal inicial, mas nunca com o endossoma tardio. Essa associação com a via endocítica inicial é transitória, já que depois de 10 minutos de internalização, a mesma diminui significativamente (Gorvel e Moreno, 2002; Moreno e Gorvel, 2004; Pizarro-Cerdá et al., 1998a).

As afirmativas anteriores puderam ser reveladas devido à presença, nos compartimentos que continham *Brucella*, de marcadores como receptores de transferrina, a proteína de união GTP Rab5, o antígeno endossomal inicial 1 (EEA1) (Chaves-Olarte et al., 2002; Pizarro-Cerdá et al., 2000).

As bactérias mortas contidas no fagossoma interagem de forma transitória com os compartimentos endossomais tardios depois de seu trânsito pelos fagossomas iniciais (Gorvel & Moreno, 2002; Pizarro-Cerdá et al., 1998a).

### 2.2.3 - Interação com o autofagossoma

Os compartimentos que contêm *Brucella* são alterados gradualmente após 1 hora de internalização em um compartimento intracelular multimembranoso (vacúolo autofágico), tanto na estirpe virulenta 2308 como na atenuada S19 (Gorvel & Moreno, 2002; Cerda Pizarro et al, 1998a).

Este compartimento possui a proteína lisossomal associada à membrana (LAMP1), mas é desprovido da hidrolase lisossomal catepsina D. Isto sugere que a *Brucella* inibe a fusão do fagossoma com compartimentos lisossomais (Moreno e Gorvel, 2004, Pizarro-Cerda et al., 1998b).

Estes fagossomas são chamados de "brucelossomas". Os fagossomas são acidificados e, como consequência, a bactéria é exposta aos radicais livres do oxigênio (Porta et al., 1999; Roop et al., 2003).

Esta localização em um ambiente ácido é importante para a multiplicação da *Brucella* e sua sobrevivência pela indução do *operon* VirB (VirB1- VirB10). O *operon* VirB interage com o retículo endoplasmático para neutralizar o pH do fagossoma (Comerci et al., 2001; Olsen et al., 2010).

Segundo Gorvel e Moreno (2002), a transferência destes agentes de um compartimento intracelular para o outro, possivelmente, poderia ser explicada pela possibilidade de os vacúolos autofágicos serem formados por invaginação do retículo endoplasmático de forma selectiva em torno dos compartimentos contendo *Brucella*.

Enquanto, nas células epiteliais, as Brucelas estão localizadas no interior de compartimentos multimembranosos compatíveis com autofagossomas, em macrófagos, os vacúolos que contêm a bactéria nunca adquirem características autofagossômicas, mas mantêm interações com o retículo endoplasmático (Celli et al., 2003; Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 1998b).

#### 2.2.4 - Interação com o Retículo Endoplasmático e a multiplicação bacteriana

Durante tempos tardios de infecção (24 horas após a inoculação), a cepa virulenta 2308 e a atenuada S19 seguem em diferentes vias intracelulares. A cepa S19 mantém a proteína LAMP1 e adquire o marcador lisossomal catepsina D (Figura 1) (Gorvel e Moreno, 2002; Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 1998b).

Isto sugere que os compartimentos que contêm estas bactérias se fundem aos lisossomas para sua degradação, de modo que a cepa atenuada não é capaz de modificar a maturação dos autofagossomas que, normalmente, se diferenciam gradualmente, adquirindo enzimas lisossomais (Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 2000).

Em contraste, a cepa virulenta perde a proteína LAMP1 e nunca adquire o marcador lisossomal catepsina D (Figura 1). No entanto, mantém o marcador Sec61 e adquire outros marcadores do retículo endoplasmático como a proteína dissulfeto isomerase e calnexina. Isto indica que a *Brucella* transita desde os autofagossomas até o retículo endoplasmático das células hospedeiras onde ocorre a multiplicação bacteriana (Moreno e Gorvel, 2004; Pizarro-Cerdá et al., 1998a; Pizarro-Cerdá et al., 2000).

Segundo Gorvel e Moreno (2002), o *operon* VirB que codifica o sistema de secreção do tipo IV é necessário para regular o tráfico intracelular, desde o compartimento do autofagossomal até o retículo endoplasmático.

Pizarro-Cerdá et al. (2000) sugerem que a associação da *Brucella* com o retículo endoplasmático pode ser um meio de obtenção de metabólitos sintetizados ou levados até este compartimento, para assim completar as necessidades nutricionais das bactérias nesta fase.

Mesmo após 48 horas após a inoculação, as células não sofrem nenhum resultado visível pela presença de centenas de bactérias no retículo endoplasmático. Apenas 72 horas após ocorre ruptura mecânica das células

invasoras devido ao crescimento exponencial das bactérias (Pizarro-Cerdá et al., 2000, Pizarro-Cerdá et al., 1998b).

O tráfego intracelular da *Brucella* tem sido descrito e estudado extensivamente. No entanto, o mecanismo que esta bactéria utiliza para persistir no hospedeiro não está claro. Identificaram uma organela derivada do autofagossoma chamada de bariforo, o qual pode ser usado por *B. abortus* para o tráfego de uma célula hospedeira para a outra, enquanto invade o sistema imune do hospedeiro (Ritchie, 2011).

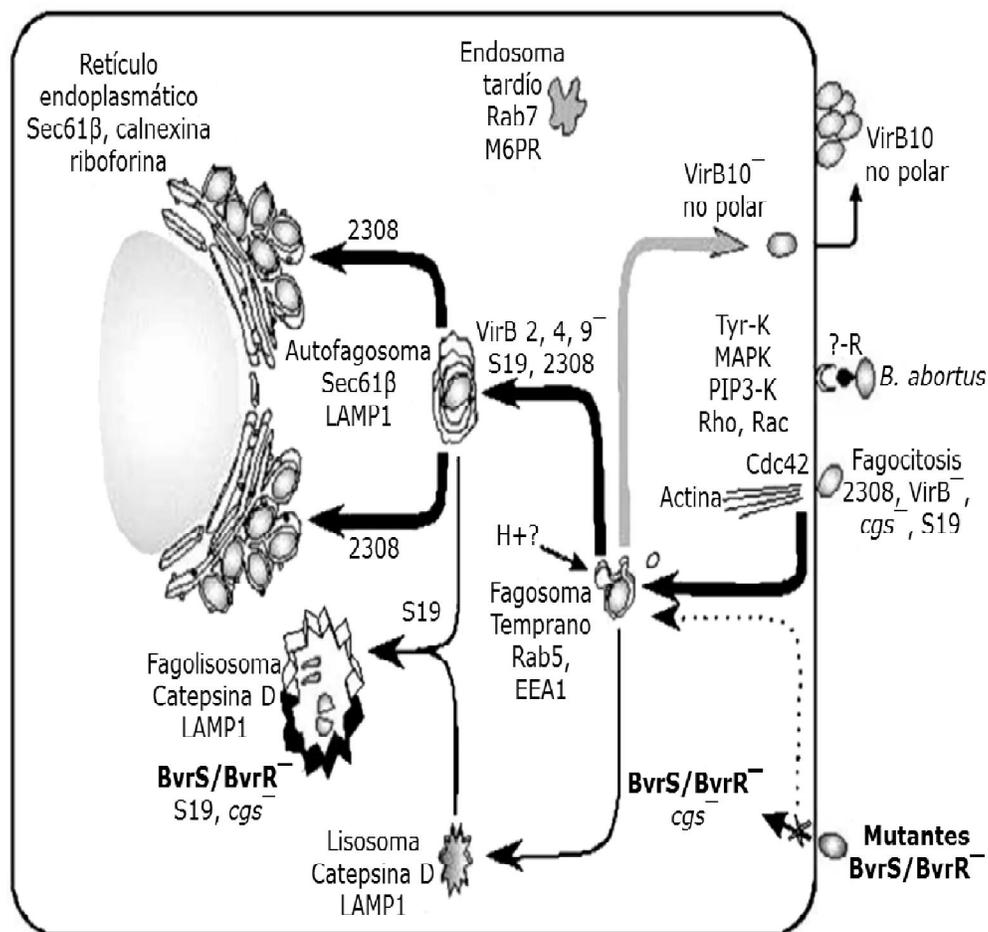


Figura 1. Modelo de invasão de *B. abortus* e o tráfego intracelular em células epiteliais HeLa. *Brucella* se liga a sítios das células-alvo por receptores desconhecidos (?-R). Em seguida, a bactéria penetra, por fagocitose, com um recrutamento de filamentos de actina, ativação de GTPases, recrutamento direto de Cdc42 e sinais mediados por mensageiros secundários. As bactérias fagocitadas se dirigem inicialmente aos compartimentos do fagossoma inicial

que pode ser acidificado ( $H^+$ ) pela aquisição de prótons. Em células HeLa, a maioria das cepas virulentas fagocitadas tem como alvo o retículo endoplasmático pela via autofagocítica, enquanto somente algumas bactérias são direcionadas para os fagolisossomas. Sinais para inibir a apoptose podem ser liberados a partir de nicho replicação da *Brucella*. As bactérias virulentas não transitam até os endossomas tardios. Modificado de: Gorvel e Moreno (2002).

### **2.3 - Fatores envolvidos na virulência da *Brucella***

#### **2.3.1 - Sistema de Secreção tipo IV**

O sistema de secreção de tipo IV (T4SSs) é uma família de complexos multiproteicos responsáveis pela secreção de macromoléculas e proteínas através da membrana celular bacteriana. O sistema de secreção de tipo IV é codificado pelo *operon* VirB, que possui 12 proteínas, as quais têm uma homologia significativa com outros T4SSs (Cascales e Christie, 2003; Delrue et al., 2005; O'Callaghan et al., 1999).

O sistema de secreção do tipo IV *VirB* da *Brucella* é importante por estar envolvido com o controle do tráfego intracelular nesta bactéria, e os mutantes deste sistema têm estas funções atenuadas (Celli et al., 2003). O mecanismo de montagem e os fatores secretados por VirB são desconhecidos. No entanto, a semelhança com a *Agrobacterium tumefaciens* sugere que a *Brucella* utiliza o mesmo sistema para a translocação de fatores de virulência em células de mamíferos (Cascales e Christie, 2003; Celli et al., 2003; O'Callaghan et al., 1999). A atual hipótese é que VirB interfere na translocação de moléculas efetoras bacterianas para o hospedeiro, os quais controlam a maturação de vacúolos contendo *Brucella*. Tais efetores não foram identificados (Celli et al., 2003).

Martinez-Núñez et al. (2010) sugerem que a transcrição de VirB esteja regulada por VjbR junto ao regulador transcricional BvrR. Além disso, o controle da expressão VirB pelo sistema BvrRS ocorre direta e indiretamente.

### 2.3.2 - Regulador transcricional VjbR

*Brucella* libera moléculas de *quorum sensing* (QS), N-acil -homoserina lactona, para sincronizar a expressão de genes dentro da população bacteriana, fenômeno que depende dos reguladores transcricionais da família LuxR (Delrue et al., 2005).

Em *Brucella*, são dois reguladores deste tipo, VjbR e BabR. Mutantes do regulador transcricional vjbR são altamente atenuados em todos os modelos experimentais, sugerindo o papel crucial para o QS na virulência da *Brucella*. Contudo, não foi atribuída nenhuma função ao regulador de BabR (Delrue et al., 2005; Uzureau et al., 2007; Uzureau et al., 2010).

Além disso, sabe-se que o QS está envolvido na regulação de determinantes de virulência em *Brucella*, principalmente aos ligados à superfície da célula: o sistema de secreção de tipo IV, flagelos, proteínas da membrana externa e exopolissacarídeos (Delrue et al., 2005; Fretin et al., 2005; Taminiou et al., 2002; Uzureau et al., 2007; Wang et al., 2010).

Os resultados obtidos por Uzureau et al. (2010) indicam que 5% dos genes em *B. melitensis* 16M são regulados por VjbR e/ou BabR. Isto sugere que o QS é um sistema regulador global nesta bactéria. Muitos dos genes regulados estão envolvidos na resposta ao estresse, metabolismo e virulência, incluindo aqueles envolvidos na adaptação da *Brucella* ao estresse causado por oxidação, pH e nutrição encontrados dentro do hospedeiro.

O aumento contínuo da concentração de *Brucella* intracelularmente faz com que a homoserina lactona também aumente, o que faz com que o revestimento de polissacarídeo que foi segregado cubra a população bacteriana. O polissacarídeo liberado deve cobrir as bactérias que serão produzidas a partir da ação dos componentes solúveis do sistema imunológico, tais como, anticorpos e complemento ou ajuda às bactérias extracelulares

liberadas, para unirem-se às células vizinhas não infectadas e, assim, iniciarem um novo ciclo de multiplicação (Godefroid et al., 2010).

Concluiu-se que tanto VirB quanto VjbR poderiam estar sob o controle direto ou indireto do sistema de dois componentes BvrR/BvrS, mediante um circuito de autorregulação que envolva os três sistemas (Chaves-Olarte et al., 2012; Martinez-Núñez et al., 2010; Viadas et al., 2010).

### **2.3.3 - Sistema de dois Componentes BvrR/BvrS**

BvrS é uma proteína homodimérica ligada à membrana que possui três domínios conservados, frequentemente encontrados em membros da família de proteínas histidino-quinases. Apresenta um domínio com um sensor periplasmático e segmentos transmembrânicos, um domínio citoplasmático de dimerização com um resíduo de histidina específico e, na região carboxi-terminal, um domínio quinase de união com o ATP (Lopez-Goñi et al., 2002.; Stock et al., 1995).

BvrR é uma proteína citoplasmática que mostra uma semelhança significativa com as proteínas reguladoras de resposta da subfamília OmpR/PhoB. Tem um resíduo de Asp específico, localizado dentro de um domínio conservado, e um domínio efetor com atividade de ligação ao DNA (Lopez-Goñi et al., 2002).

O sistema regulatório BvrR/BvrS desempenha um papel fundamental no controle da virulência. Acredita-se que BvrS/BvrR é essencial para detectar o ambiente fagossomal e, assim, induzir alterações que habitam as bactérias ao meio intracelular e extracelular. BvrS/BvrR está envolvido em internalização da *Brucella* em fagócitos profissionais e não profissionais (Guzmán-Verri et al., 2002; López-Goñi et al., 2002; Sola-Landa et al., 1998a).

O sistema de dois componentes também está envolvido na homeostase estrutural e funcional da membrana externa. Exerce forte influência, especialmente sobre o grupo três proteínas Omp, lipoproteínas, LPS, vários

transportadores periplasmáticos e componentes de resposta ao estresse (Guzmán-Verri et al., 2002; Lamontagne et al., 2007; Manterola et al., 2007).

BvrR/BvrS se encarrega de apagar genes desnecessários usados para a sobrevivência extracelular e acender aqueles que são essenciais para a invasão e sobrevivência intracelular. De acordo com Guzmán-Verri et al. (2002), o mencionado acima ocorre porque este sistema altera a hidrofobicidade da superfície celular, além de alterar sua permeabilidade e sensibilidade a peptídeos bactericidas da superfície celular (Mekalanos, 1992; Sola-Landa et al., 1998a).

Este sistema de dois componentes é o fator melhor caracterizado e o mais associado com a virulência da *Brucella*. O Sistema é homólogo ao sistema ChvI/ChvG de *A. tumefaciens* e *Sinorhizobium meliloti*, os quais são necessários para patogenicidade e endossimbiose em plantas, respectivamente (Guzmán-Verri et al., 2002).

Viadas et al. (2010) sugerem que o sistema BvrR/BvrS poderia neutralizar a produção de moléculas de nitrogênio reativas e tóxicas, como o Óxido Nítrico (NO), pelo hospedeiro. Além disso, BvrR/BvrS controla os elementos envolvidos diretamente com a adaptação da *Brucella* à mudança de nutrientes esperada durante o trânsito para o nicho intracelular (Viadas et al., 2010).

Mutações no sistema BvrR/BvrS impedem a produção das proteínas Omp25 e Omp22, que produzem LPS com falha estrutural, mesmo com a cadeia O parecendo estar intacta, e diminuem a resistência característica da *Brucella* aos bactericidas além de aumentarem a permeabilidade aos surfactantes (Guzmán-Verri et al., 2002; Sola-Landa et al., 1998b).

Manterola et al. (2005) relataram que os mutantes em BvrR/BvrS aumentam a hidrofobicidade da superfície da bactéria em relação ao meio externo e são susceptíveis à morte por soro não imune.

Mutantes BvrR/BvrS são mais suscetíveis a substâncias bactericidas policatiônicas como polimixina B ou poli-L-lisina. Além disso, ocorrem alterações em algumas moléculas, tais como, o lipídio A (pouca acilação) e um

aumento na fluidez da cadeia acil do LPS (Manterola et al., 2007; Sola-Landa et al., 1998a).

Os mutantes em BvrS/BvrR são avirulentos em camundongos, mostrando invasividade reduzida nas células e, além disso, incapacidade de inibir a fusão de lisossomas, de replicar intracelularmente, e possuem defeitos para aderir bem ao hospedeiro (Guzmán-Verri et al., 2002; Sola-Landa et al., 1998b).

Mutantes no sistema de dois componentes têm alterada sua capacidade de invadir células, não recrutam GTPases pequenas (Cdc42) da subfamília Rho, que são necessárias para a polimerização de actina e a penetração celular. Assim, estes mutantes permanecem ligados à superfície da célula hospedeira devido à sua incapacidade de penetrar nas células (Guzmán-Verri et al., 2001; Sola-Landa et al., 1998b).

De acordo com a análise do transcriptoma realizada por Viadas et al. (2010) com a cepa *B. abortus* 2308 e *B. Abortus* BvrR, os genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e em processos celulares estão dentro dos genes expressos mais no mutante BvrR, e aqueles que codificam proteínas envolvidas no transporte de membrana estão localizados dentro dos genes que são expressos, exceto no mutante BvrR. Por exemplo, todos os genes relacionados com o metabolismo dos carboidratos, aminoácidos ou ácidos se expressaram mais no mutante *B. abortus* BvrR que na cepa de *B. abortus* 2308.

De acordo com Martínez-Nunez et al. (2010), o sistema de dois componentes é um regulador principal dos genes de virulência, detectando quando *B. abortus* entra em uma célula hospedeira eucariótica e ativa várias rotas importantes para este ciclo intracelular. Os genes candidatos regulados pelo sistema de dois componentes BvrR/BvrS foram identificados por Viadas et al. (2010) (Figura 2).

Martínez-Núñez et al. (2010) e Viadas et al. (2010) demonstraram que o sistema de dois componentes controla a expressão do sistema de secreção tipo IV VirB. Tais autores demonstraram que mutantes no sistema de dois componentes mostraram níveis baixos de expressão das proteínas VirB1, VirB5,

VirB8 e VirB9, as quais se sobreexpressaram em um mutante BvrR, complementado com um plasmídeo portador do gene funcional BvrR (*B. abortus* BvrR<sup>-</sup> BvrR<sup>+</sup>) (Martínez-Núñez et al., 2010).

Em relação à expressão de genes reguladores da transcrição, os genes ExoR, ompR e vjbR são regulados por BvrR e têm sido envolvidos na virulência da *Brucella* (Viadas et al., 2010).

A expressão do ativador de transcrição VjbR (determinante da expressão VirB) depende também do sistema de dois componentes (Viadas et al., 2010). Este sistema afeta positivamente a transcrição de VjbR e, então, este fator de transcrição regula a transcrição de VirB, juntamente com a participação direta de BvrR (Martínez-Núñez et al., 2010).

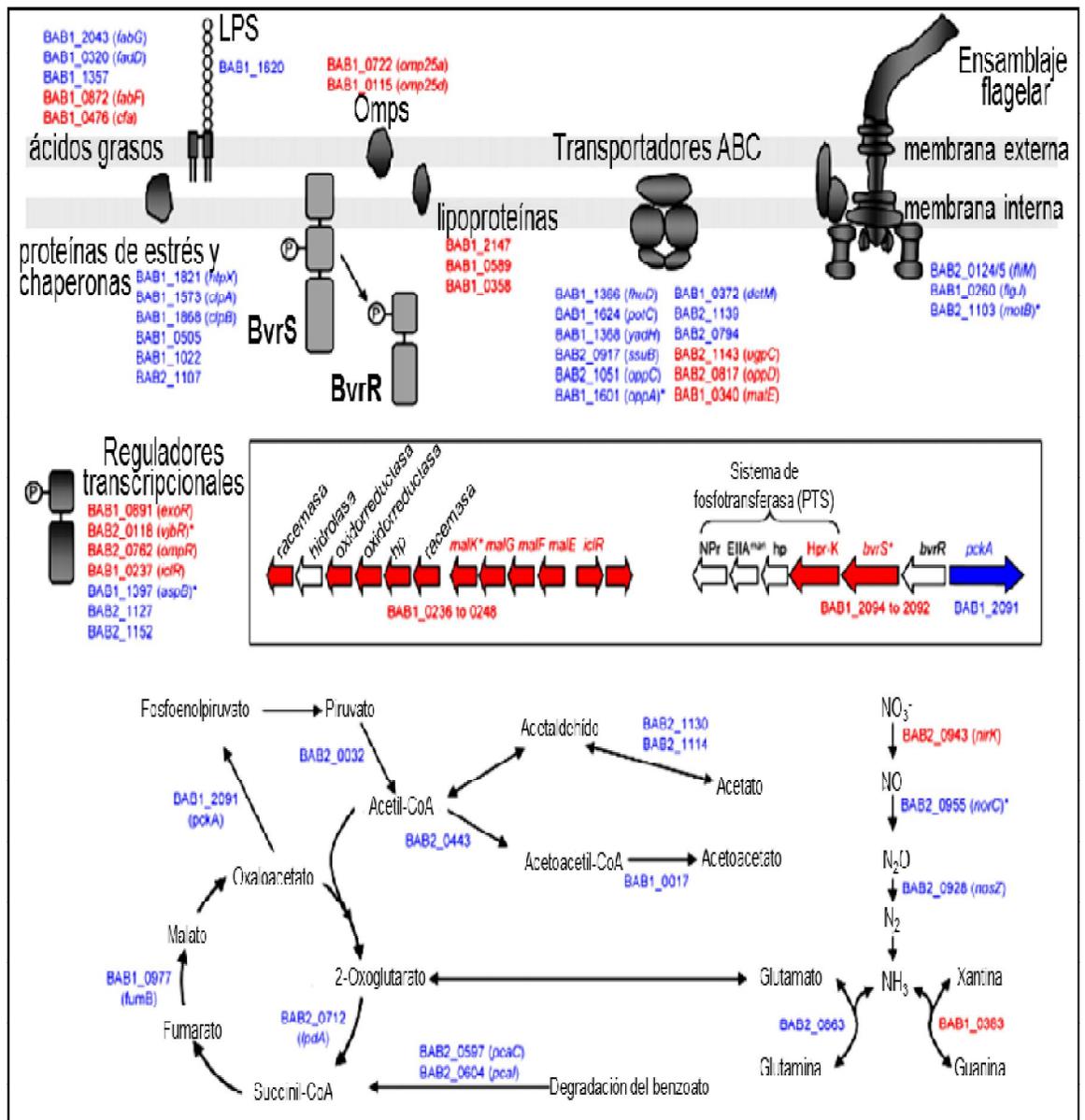


Figura 2: Diagrama de genes candidatos, regulados pelo Sistema de dois Componentes BvrR/BvrS identificados por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-PCR). Os genes regulados positivamente são mostrados em azul e os genes regulados negativamente são mostrados em vermelho. O asterisco indica genes que tenham sido previamente associados à virulência em *Brucella*. Modificado de: Viadas et al, 2010.

## 2.4 - Modelo do funcionamento do sistema de dois componentes e outros fatores de virulência

Análises proteômicas realizadas com mutantes no sistema de dois componentes, *B. abortus* BvrS e *B. abortus* BvrR, mutantes do regulador transcricional VjbR e sistema de secreção de tipo IV têm permitido criar um modelo unificado em que estes três sistemas interagem para permitir a infecção com êxito nas células hospedeiras. Este modelo pode ser mostrado na Figura 3 (Chaves -OlarTE et al. , 2012).

Uma vez dentro da célula hospedeira, a bactéria percebe o novo ambiente pelos sinais intracelulares específicos, como a acidificação do fagossoma inicial. A bactéria percebe tais sinais por meio do sensor BvrS, que se autofosforila e induz a fosforilação do regulador BvrR. BvrR fosforilado se liga à região promotora do regulador transcricional VjbR ativando sua transcrição. Também se liga ao seu próprio promotor e a promotores de genes envolvidos na síntese de proteínas de membrana externa e periplasmáticas, VirB e genes de síntese de LPS (Lamontagne et al., 2007; Manterola et al., 2005; Martinez-Nunez et al., 2010; Viadas et al., 2010).

A concentração de homosserina lactona é baixa, permitindo que VjbR se ligue aos promotores de genes que regulam negativamente. Portanto, não existe a transcrição de genes envolvidos na síntese de proteínas, DNA e divisão celular (Figura 3) (Chaves-OlarTE et al., 2012; Lamontagne et al., 2009; Uzureau et al., 2010).

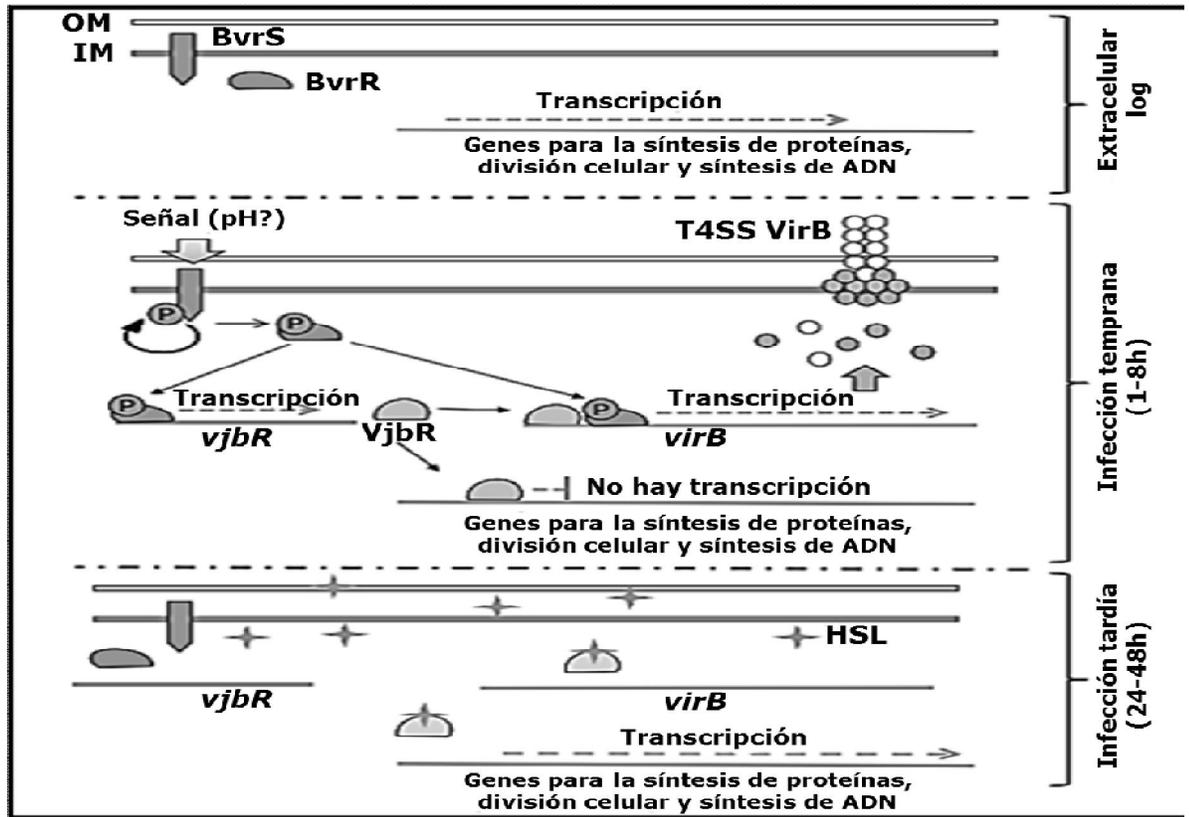


Figura 2. Modelo de vias regulatórias e interações entre diferentes sistemas durante adaptação da *Brucella* ao nicho intracelular. Durante a infecção inicial, o sistema de dois componentes BvrRS controla a expressão do sistema de secreção do tipo IV (VirB) e do regulador transcricional VjbR. A ativação do sistema de dois componentes pode estar relacionada a um sinal de acidificação encontrado intracelularmente nos fagossomas iniciais. Uma vez que a *Brucella* atinge o seu nicho replicativo no compartimento derivado do retículo endoplasmático, a expressão de BvrS e BvrR diminui drasticamente para evitar hiperativação. Modificado de: Chaves-Olarte et al. (2012).

Uma vez que o regulador está fosforilado e se une ao promotor de VirB, os genes flagelares são ativados, permitindo a secreção de fatores, tais como, VceA e VceC, necessários para a evasão da rota fagolisossomal e recrutamento de vesículas oriundas do retículo endoplasmático (Chaves-Olarte et al., 2012; De Jong et al., 2008; Rambow-Larsen et al., 2008).

Segundo Lamontagne et al. (2009), para evitar a hiperativação da resposta, o nível de BvrR é diminuído consideravelmente. Uma vez que a

*Brucella* cria o compartimento derivado do retículo endoplasmático e se replica, a concentração de homosserina lactona começa a aumentar, atingindo uma concentração capaz de diminuir a atividade de ligação de VjbR ao DNA. A síntese da proteína inicia, os transportadores se dirigem para a membrana e a maquinaria de divisão começa a funcionar, permitindo que a *Brucella* se replique exponencialmente (Chaves-Olarte et al., 2012).

### **3 – Objetivos**

#### **3.1 – Objetivo Geral**

Quantificar a expressão de genes de virulência, regulados direta e indiretamente, pelo Sistema de dois Componentes BvrR/BvrS em *Brucella* spp.

#### **3.2 – Objetivos Específicos**

Estandardizar um protocolo para determinar a expressão de genes de virulência por High Resolution Melt RT-PCR.

## 4 – Materiais e Métodos

### 4.1 – Curva de crescimento e preparo das amostras

A *Brucella abortus* 2308 é uma cepa virulenta lisa, descrita por Sangari e Agüero (1991), e amplamente utilizada nas pesquisas envolvendo *Brucella*.

Primeiramente, é feito o pré-cultivo da *B. abortus* 2308, em 20 mL de meio CTS (Tryptic Soy Broth/ Difco - EUA), no qual é incubado por 24 horas, em 37°C a 200rpm. Utilizando a fórmula (1), faz-se o cálculo de Unidade Formadora de Colônia (UFC) obtida no período de pré-cultivo a 420 nm.

$$X = \text{Absorbância} - 0.0291/1 * 10^{-11} \quad (1)$$

Com o resultado obtido de UFC, calculamos o inóculo inicial de  $5 \times 10^9$  UFC em 20 mL de CTS a 37°C e em 200rpm, com a fórmula (2)

$$Y = 5 * 10^9 / X \quad (2)$$

O resultado obtido, nesta etapa, é o volume de pré-cultivo que foi utilizado em 20 mL de CTS.

A partir desta etapa, a curva de crescimento de *B. abortus* 2308 foi feita para a caracterização das fases de crescimento a partir de um inóculo fixo ( $5 * 10^9$  UFC), com o objetivo de posterior fixação do ponto na curva para a extração de RNA total.

A premissa inicial é estabelecer a curva de crescimento e, desta forma, é medida a absorbância a cada 1 hora até completar 28 horas de crescimento bacteriano. A fim de controlar e averiguar a absorbância obtida, semeiam-se  $10^6$  bactérias em ATS (Trypticase Soy Ágar - Difco – EUA) em triplicata, a cada

2 horas, e sementeiras em ATS, somente para verificação de controle de contaminantes alternadamente.

A partir da obtenção da curva de crescimento, foi fixado o tempo de 17 horas dentro da mesma para a obtenção de amostras.

Amostras de 1 mL foram retiradas no tempo estabelecido de trabalho, centrifugadas a 10.000xg e, após o descarte do sobrenadante, agregam-se 500µL de RNAprotect® (Qiagen – EUA) ao pellet obtido.

#### 4.2 – Extração de RNA total

A partir de cultivos de *B. abortus* 2308 lisa em CTS, com inóculo de  $5 \times 10^9$  UFC, e crescimento de 17 horas a 37°C em 200 rpm, eram retiradas alíquotas com  $1 \times 10^9$  UFC por extração e, a cada cultivo trabalhado, semeavam-se duas placas com ATS de controle de contaminantes.

As alíquotas com cálculo prévio, contendo  $1 \times 10^9$  UFC do cultivo, foram centrifugadas a 10.000xg e, após o descarte do sobrenadante, seguia-se o procedimento de lise bacteriana.

O procedimento de lise iniciava-se ao agregar 100 µL de Switergent a 10%, previamente aquecido por 20 minutos. A amostra era ressuspensa até o *pellet* dissolver completamente e incubada a 37°C por 1 hora no forno de hibridização.

Após esse período, foram agregados, a cada alíquota, 100 µL de Tampão TE 1x com pH 8.0 e 4 µL de Lisozima (50mg/mL), incubando as alíquotas a 37°C por 20 minutos no forno de hibridização.

A extração de RNA total de *B. abortus* 2308 lisa foi feita com o RNeasy Midi Kit Qiagen cat. 74104 (Qiagen – EUA) e seguiu as seguintes etapas: transferir a amostra para tubos cônicos de 15 mL estéril; a cada tubo, agregar 2 mL de Tampão RLT + Mercaptoetanol (previamente preparado em uma proporção de 1:10) e mesclar a mistura em *vortex*; centrifugar a 5000xg por 5 minutos em T.A.; transferir o sobrenadante a um novo tubo cônico de 15 mL

estéril; passar o conteúdo a uma pressão de uma de 5 mL e uma agulha de 21G, por 20 vezes, e agregar a amostra 1.4 mL de etanol absoluto e homogeneizar em *vortex*. Dispensar toda a amostra para uma coluna do RNeasy Midi Kit Qiagen cat. 74104 (Qiagen – EUA) e centrifugar a 5000xg por 5 minutos em T.A.; descartar o precipitado e agregar 4 mL de Tampão RW1 à coluna e novamente centrifugar a 5000xg por 5 minutos em T.A.; descartar novamente o centrifugado e agregar 2.5 mL de tampão RPE a coluna e centrifugar a 5000xg por 5 minutos em T.A., repetindo esta operação mais uma vez. Colocar os tubos a 37°C por 10 minutos não fechando a tampa completamente.

Após os procedimentos acima descritos, inicia-se o processo de eluição. Transfere-se a coluna para um novo tubo cônico de 15 mL da coleção e agregam-se 150µL de água livre de RNases, incubados por 10 minutos e centrifugados a 5000xg por 3 minutos. Repetiu-se a etapa anterior mais uma vez e, após este último procedimento, realizamos alíquotas da amostra de ARN extraída, quantificando e armazenando-as a -70°C até as seguintes etapas.

Para a determinação da concentração e da pureza do RNA, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Nanodrop Technologies) e razões 280/260 nm e 260/230 nm. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8,0), corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta.

Após a avaliação do extraído, se houvesse resquícios de DNA no gel de agarose 2%, este passaria por uma etapa de tratamento com a Turbo-DNA free (AMBION).

O controle do RNA obtido foi feito com um Minus RT contra o gene L7L12LL1, utilizado, neste trabalho, como um gene de referência. Todas as reações de Minus RT, neste estudo, foram realizadas utilizando o kit Type-it HRM PCR cat. 206542 (Qiagen). As reações de 25 µl continham 12,5µl de HRM PCR Master Mix 2x, que possuem o fluoróforo EvaGreen, HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, dNTPs, and MgCl<sub>2</sub>; e o tampão da enzima e os 12.5 µl restantes foram adaptados entre amostra, iniciadores e H<sub>2</sub>O. Os ensaios foram

realizados no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences) com o rotor de 36 poços.

O programa de ciclagem do gene definido acima incluía a ativação da enzima a 95°C por 10 minutos e, em seguida, 30 ciclos de 5 segundos de desnaturação a 95°C, 10 segundos de anelamento com a temperatura de 60°C, e 20 segundos de extensão a 72°C.

A análise da amplificação seria avaliada e, se realmente não houvesse amplificação das amostras de RNA e somente o controle positivo, DNAg (DNA genômico – Wizard Genomic DNA Purification kit) tivesse amplificado, começaria a próxima etapa.

Desse modo, na sequência, haveria uma nova etapa de quantificação, com as mesmas características operacionais anteriormente citadas e, se a amostra avaliada, tivesse de acordo com os padrões esperados, a retrotranscrição seria realizada.

### **4.3 - Síntese de cDNA**

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Revert Aid (Fermentas), a partir de 15 ng de RNA total, acrescidos de dNTP (10 mM); oligo-(dT) (0,4µM); inibidor de RNase *Ribolock*, transcriptase reversa Revert Aid.

A pureza do cDNA foi checada por PCR contra o gene L7L12LL1. O programa de ciclagem do gene de referência segue as mesmas especificações descritas anteriormente, que são: ativação da enzima a 95°C por 10 minutos; em seguida, 30 ciclos de 5 segundos de desnaturação a 95°C; 10 segundos de anelamento com a temperatura de 60°C, e 20 segundos de extensão a 72°C.

### **4.4 – Desenho dos iniciadores**

Os iniciadores específicos utilizados neste estudo foram desenhados, utilizando o programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Os seguintes genes foram desenhados para este estudo: proteína ribossomal (L7L12LL1); regulador transcricional (VjbR); proteína do sistema de secreção tipo IV (VirB5); regulador citoplasmático proteico, pertencente ao sistema de dois componentes (BvrR); proteína de membrana externa (OMP25); regulador periplasmático (ExoR).

A proteína ribossomal L7L12 foi utilizada para a normalização, já que é necessária para padronização do método de expressão relativa (Schmittgen e Livak, 2008).

Os iniciadores utilizados estão apresentados na Tabela 1. Os iniciadores foram desenhados de forma a produzirem amplicons menores que 200 pb, já que, acima deste tamanho, a eficiência da reação de PCR é prejudicada (Cosseau et al., 2009).

Gene	Sequência dos iniciadores (5' – 3')		Amplicons (bp)	Tm (°C)
	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>		
L7L12	GCTGTCCAAGCTTCTCGAAGA	CCGGCAGCAGCAACAG	69	84
BvrR – 1	CATGGACGGTATGGAGCTTCTG	GAGGAAGATGACCGGCAGATC	65	84
BvrR – 2	GATGATGACCGCAACATCCT	GGTTTCGACGCGATAACCTT	69	81
VirB5	GAGCGGCGGCTACCT	GGATCGTATACCTGGCTTTTGC	69	84
VjbR	TGAAATAGGATGCCGCTACG	AATTCACCTTCGTGCAGTCG	68	80
Omp25	CACCGATTACGGCAAGAAGA	TCGTTGGTCTTGAACGAACC	69	79
ExoR – 1	ATGGGCGCATCCCTTTAC	CGCCACCAGGTTGAAGAA	67	81
ExoR – 2	GATGTGAGCCACGAACCTCAA	ATCAGCCGCTTCTTCGATTC	66	79

Tabela 1: Sequência dos pares de iniciadores desenhados, tamanho dos amplicons e temperatura de *melting* utilizada nas reações de RT-PCR.

#### 4.5 - Padronização das reações de RT-PCR por HRM (High Resolution Melting) com o gene de referência L7L12

Todas as reações de RT-PCR, neste estudo, foram realizadas utilizando o kit Type-it HRM PCR cat. 206542 (Qiagen). As reações de 25 µl continham 12,5µl de HRM PCR Master Mix 2x, que possuem o fluoróforo EvaGreen, HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, dNTPs, and MgCl<sub>2</sub> e o tampão da enzima, e os 12.5 µl restantes foram adaptados entre amostra, iniciadores e H<sub>2</sub>O. Os ensaios foram realizados no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences) com o rotor de 36 poços.

O programa de ciclagem do gene de referência definido acima incluiu a ativação da enzima a 95°C por 10 minutos; em seguida, 30 ciclos de 5 segundos de desnaturação a 95°C; 10 segundos de anelamento com a temperatura de 60°C; e 20 segundos de extensão a 72°C, fase onde ocorreu a aquisição de fluorescência.

Posteriormente, a curva de dissociação foi realizada mediante o aumento de 1°C a cada 5 segundos, partindo de 70°C e terminando a 90°C, para analisar o perfil dos produtos formados. O par de iniciadores do gene L7L12 foi testado em triplicatas nas concentrações de 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng, 1,25 ng, 0,625 ng e 0,3125 ng de cDNA do tempo de 17 horas de cultivo. A escolha das concentrações a serem utilizadas nos ensaios foi baseada nos valores de CT (Threshold Cycle), onde o menor valor foi selecionado, o que refletiu uma maior eficiência da reação. A análise da curva de dissociação também foi determinante na escolha da concentração de iniciador para as reações. As condições encontradas foram testadas na construção de uma curva-padrão, construída a partir de diluições seriadas do cultivo de 17 horas previamente trabalhado e transcrito em cDNA. As curvas-padrão serviram como teste da eficiência da reação, em que uma curva-padrão ótima apresenta valor de eficiência de 1 (100% de amplificação por ciclo), situação na qual as concentrações da curva devem corresponder com as diluições realizadas e, além disso, apresentar reprodutibilidade. Foi selecionada a curva que apresentou estas características por pelo menos três vezes.

O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica e, assim, o limiar foi

delimitado, baseando-se no coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e na eficiência da curva ( $E$ ), calculada pelo próprio aparelho.

#### **4.6 – Padronização e análise das reações de RT-PCR por HRM dos genes de virulência diretos e indiretos**

Tais reações de RT-PCR, neste estudo, também foram realizadas utilizando o kit Type-it HRM PCR cat. 206542 (Qiagen). As reações de 25  $\mu$ L continham 12,5 $\mu$ L de HRM PCR Master Mix 2x, que possui o fluoróforo EvaGreen, HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, dNTPs, and  $MgCl_2$ , o tampão da enzima, e os 12.5  $\mu$ L restantes foram adaptados entre a amostra, iniciadores e H<sub>2</sub>O. Os ensaios foram realizados no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences) com o rotor de 36 poços.

O programa de ciclagem do gene de virulência definidos acima (ExoR, BvrR, VjbR, VirB, Omp25) incluía a ativação da enzima a 95°C por 10 minutos; em seguida, 30 ciclos de 5 segundos de desnaturação a 95°C; 10 segundos de anelamento com a temperatura de 60°C; e 20 segundos de extensão a 72°C, fase onde ocorreu a aquisição de fluorescência.

Posteriormente, a curva de dissociação foi realizada mediante o aumento de 1°C a cada 5 segundos, partindo de 70°C e terminando a 90°C, para analisar o perfil dos produtos formados. Os pares de iniciadores dos genes de virulência foram testados pelo menos em quatro diluições, em triplicata, em um intervalo que variasse entre as concentrações de 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng, 1,25 ng, 0,625 ng e 0,3125 ng de cDNA do tempo de 17 horas de cultivo. O objetivo desta mudança de metodologia, em relação ao gene de referência, foi avaliar o ponto mínimo de detecção de cada gene de virulência trabalhado, diante dos iniciadores desenhados, e também do mínimo detectável em relação à especificidade do equipamento.

A escolha das concentrações a serem utilizadas nos ensaios foi baseada nos valores de CT, onde o menor valor foi selecionado, refletindo uma maior

eficiência da reação e pico de *melting* aparente e específico. A análise da curva de dissociação também foi determinante na escolha da concentração de iniciador para as reações. As condições encontradas foram testadas na construção de uma curva-padrão, construída a partir de diluições seriadas do cultivo de 17 horas previamente trabalhado e transcrito em cDNA.

As curvas-padrão serviram como teste da eficiência da reação, em que uma curva-padrão ótima apresenta valor de eficiência de 1 (100% de amplificação por ciclo), situação na qual as concentrações da curva devem corresponder com as diluições realizadas e, além disso, apresentar reprodutibilidade. Foram selecionadas as curvas e, portanto, os intervalos de diluição que apresentassem pelo menos 0,8 de eficiência, e mesmo assim esta característica tinha que apresentar reprodutibilidade de pelo menos duas vezes.

O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica e, assim, o limiar foi delimitado, baseando-se no coeficiente de correlação (R2) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

## 5 – Resultados

### 5.1 – Obtenção da curva de crescimento para *B. abortus* 2308

O Gráfico 1 demonstra a curva de crescimento de *B. abortus* 2308 obtida a partir de um inóculo de  $5 \cdot 10^9$  UFC.

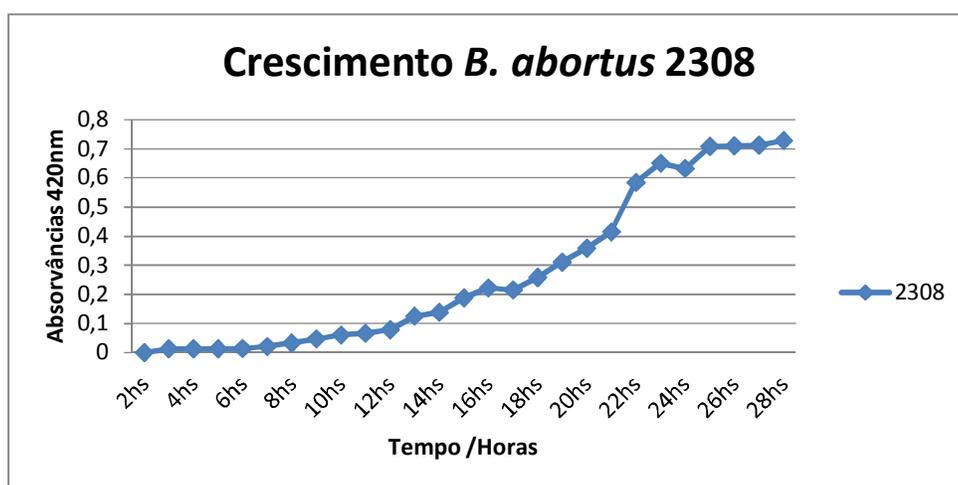


Gráfico 1: Crescimento de *B. abortus* 2308 a partir de um inóculo fixo.

### 5.2 - Padronização das reações de RT-PCR

As reações de padronização mostraram amplificação de um único produto em todos os genes testados neste estudo, sem a presença de contaminação e com ruído de fundo mínimo e esperado, diante da utilização do fluoróforo Evagreen. Para todos os genes testados, os valores de CT foram padronizados, para que a condição final adotada, em todas as reações deste trabalho, tivesse um mínimo valor.

A Tabela 2 demonstra os valores de coeficiente de correlação ( $R^2$ ), inclinação da reta (*slope* ou M) e eficiência da reação ( $100\%=1$ ) obtidos para os

diferentes genes testados. As reações padronizadas apresentaram pelo menos um par de iniciadores por gene, com uma eficiência e coeficiente de correlação semelhante sob duas repetições mínimas.

Gene	R <sup>2</sup>			Inclinação (M)			Eficiência (E)		
	Número de repetições			Número de repetições			Número de repetições		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
L7L12	0,961	0,961	0,999	-3,37	-3,32	-3,72	1,00	1,00	0,86
BvrR - 1	0,995	0,996	0,988	-4,17	-4,1	-6,01	0,74	0,74	0,47
BvrR - 2	0,994	0,998	0,997	-3,45	-3,41	-3,59	0,95	0,97	0,90
VjbR	0,906	0,776	-	-3,39	-3,35	-	0,97	0,99	-
Omp25	0,964		-	-3,51		-	0,93		-
ExoR - 1	0,972	0,982	-	-4,26	-3,96	-	0,72	0,79	-
ExoR - 2	0,99	-	-	-3,4	-	-	0,94		-
VirB5*	0,96	0,96	0,96	-3,32	-4,1	-3,8	1,00	0,75	0,83
VirB5**	0,988	0,982	-	-3,41	-3,49	-	0,97	0,94	-

Tabela 2: Compilação dos resultados obtidos das curvas padrões geradas na padronização das reações de RT-PCR realizadas. Valores dos coeficientes de correlação (R<sup>2</sup>), inclinação da reta (M) e eficiência da reação (100%=1). \* X *Brucella abortus* / \*\* X *Brucella canis*

Como o objetivo do trabalho era ter reações para cada gene com características semelhantes no RT-PCR, as escolhas dos pares de iniciadores correlacionados foram feitas nesta etapa. Assim, os seguintes pares de iniciadores foram utilizados: L7L12 (como gene de referência), BvrR -2, VjbR, Omp 25, ExoR -2 e VirB5 (este gene foi padronizado frente às espécies *B. abortus* e *B. canis*).

### 5.3 – Análise da expressão do gene de referência

As reações do gene de referência L7L12 foram realizadas em triplicata por diluição, assumindo a média entre os valores de CT encontrados em cada diluição. A Figura 4 representa o conjunto de gráficos dos perfis de amplificação frente às diferentes concentrações utilizadas, curvas de dissociação gerada e à curva Standard relativa. Foi observada a formação de um pico representando amplicons únicos e com pouco ruído.

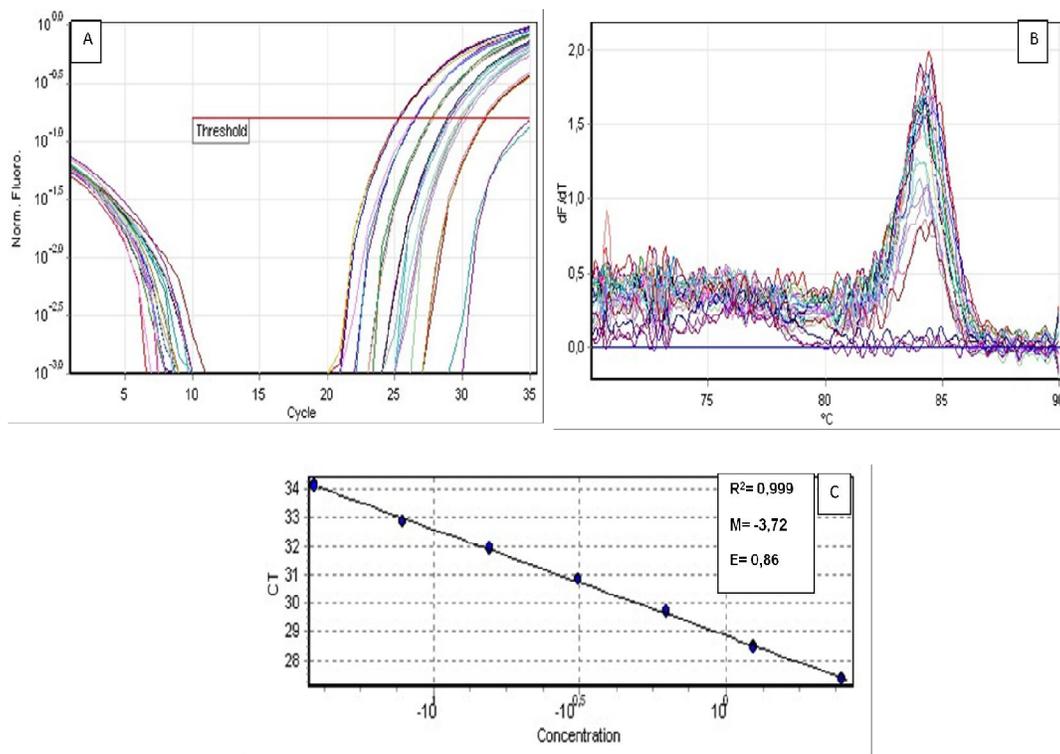


Figura 4: Representação das análises obtidas frente ao gene de referência L7L12 de uma das repetições realizadas. (A) Demonstração do perfil de amplificação à frente de diferentes concentrações, com detalhamento dos ciclos e estabelecimento do Threshold, (B) perfil da curva de dissociação obtida, (C) curva Standard relativa.

#### 5.4 – Análise da expressão dos genes de virulência

As reações de RT-PCR dos genes de virulência (BvrR, VjbR, Omp25, ExoR, VirB5) foram realizadas conforme descrito anteriormente. A Figura 5 expõe uma demonstração dos gráficos das análises de curva de dissociação, geradas nas reações com alguns genes utilizados, mostrando a formação de um pico que representa amplicons únicos, para cada um dos genes analisados, e de suas respectivas diluições seriadas utilizando base 2.

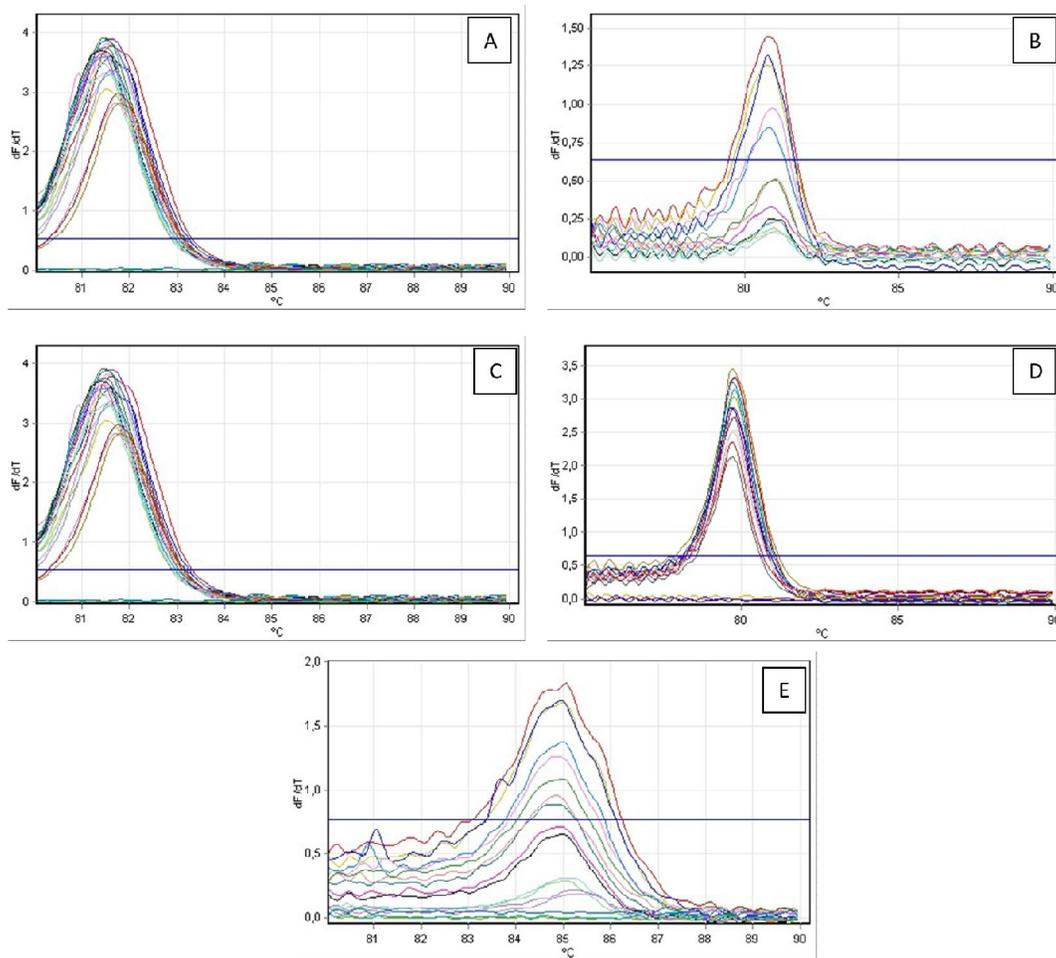


Figura 5: Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse. (A) BvrR-2, (B) VjbR, (C) Omp 25, (D) ExoR – 2, (E) VirB5 (contra *B. canis*).

Percebe-se, para alguns genes, que a sensibilidade de detecção variou um pouco, como exemplo, pode-se afirmar que, abaixo de 1,25 ng/reacção, a

detecção do gene VjbR fica comprometida, do mesmo modo que a detecção do gene VirB5 com concentração abaixo de 2,5 ng/reação.

Os outros genes de virulência trabalhados apresentam boa sensibilidade mínima, 0,625 ng para o gene BvrR-2 e 0,1563 ng por reação para os genes Omp25 e ExoR – 2.

Os resultados obtidos com os desenhos de iniciadores do gene ExoR (1 e 2), utilizados neste trabalho, estão demonstrados na Figura 6.

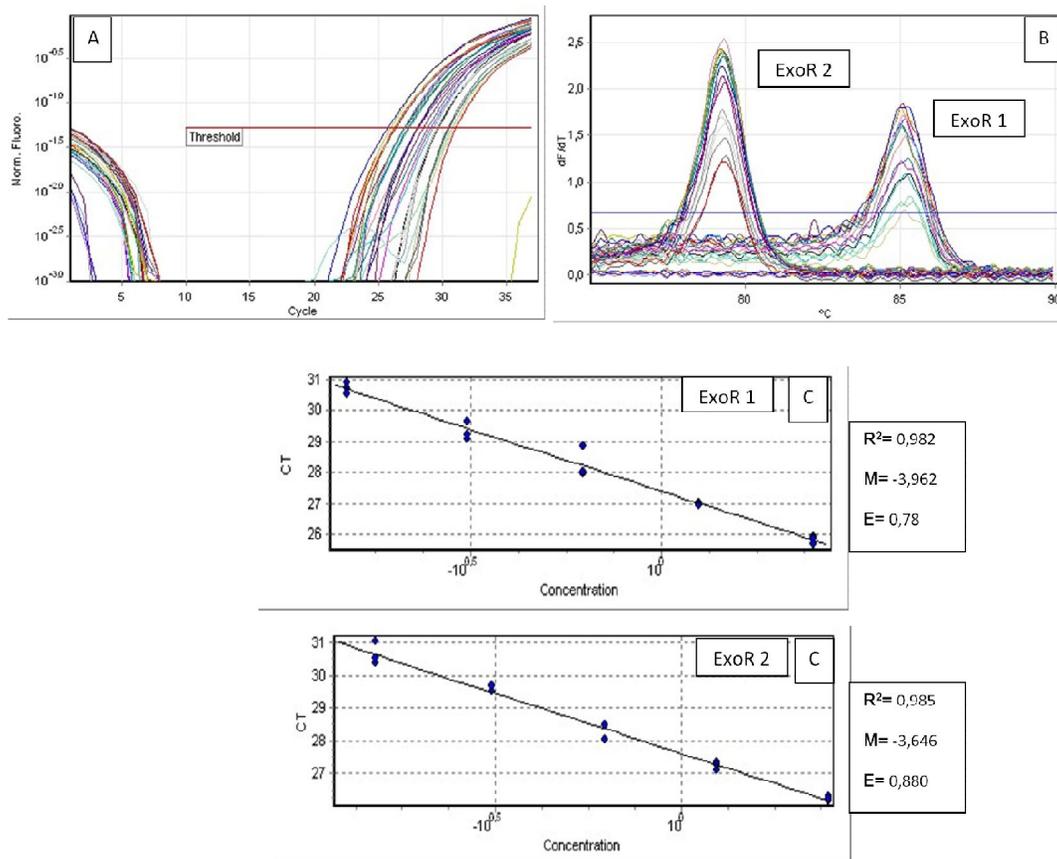


Figura 6: Análise dos dois pares de iniciadores do gene ExoR utilizados. (A) Amplificação resultante dos dois desenhos de *primers* e as concentrações utilizadas de 2,5 ng a 0,1563 ng/reação, com detalhamento dos ciclos e estabelecimento do Threshold; (B) Perfis das curvas de dissociação do gene ExoR 1 e 2; e (C) Análise em separado dos pares de iniciadores utilizados para o gene ExoR, demonstrando M, E e  $R^2$ .

As análises obtidas, para o par de iniciadores ExoR – 1, demonstraram picos de amplificação com baixa obtenção de fluorescência e com sensibilidade mínima até 0,3125 ng/reação, considerando o intervalo de diluição utilizado de 2,5 ng/reação até 0,1562 ng/reação. Já as análises realizadas frente ao par de iniciadores ExoR - 2 demonstraram picos de amplificação únicos, uniformes e com alta fluorescência, sendo que todas as diluições testadas apresentaram especificidade e obtenção de fluorescência melhores quando se compara ao mesmo intervalo de diluição utilizado para Exo – 1.

Apesar de os CTs não terem variado de um par de iniciadores para o outro, a eficiência aumentou de 0,78 para 0,88 de ExoR -1 para ExoR - 2, o que demonstra claramente uma melhora na reação.

A Figura 7 estabelece uma análise comparativa dos pares de iniciadores do gene BvrR utilizados neste trabalho frente à *B. Abortus*.

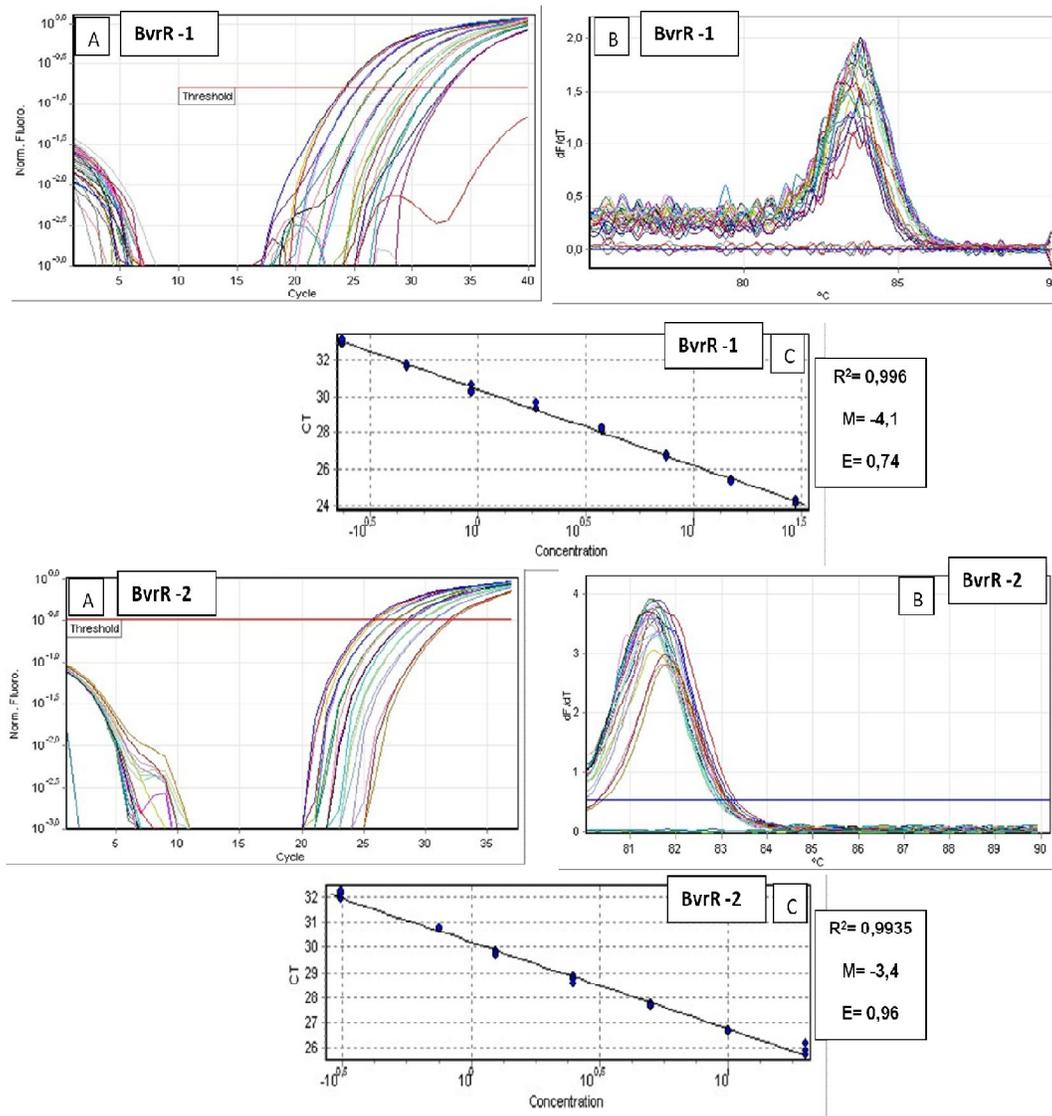


Figura 7: Análise dos dois pares de iniciadores do gene BvrR utilizados. (A) Amplificação resultante dos dois desenhos de *primers*. As concentrações utilizadas de cDNA de *B.abortus*, frente ao BvrR -1, foram de 30 ng a 0,2344 ng/reação, e de cDNA de *B.abortus*, frente ao BvrR -2, foram de 20 ng/reação a 0,625 ng/reação, utilizando uma base de diluição 2, com detalhamento dos ciclos e estabelecimento do Threshold; (B) Perfis das curvas de dissociação relativas aos pares de iniciadores ExoR - 1 e 2, conforme especificado em cada figura; e (C) curva Standard relativa para cada par de iniciador utilizado, conforme especificado em cada figura, junto aos seus perfis de  $R^2$ , M e E.

A análise comparativa dos pares de iniciadores para BvrR – 1 apresentaram mais ruído, quando comparado ao do BvrR – 2, o que se pode

afirmar com os resultados obtidos que, apesar da qualidade de detecção até a concentração de 0,2344 ng/reação, as repetições das reações com este par de iniciadores em específico sempre apresentavam alto coeficiente de correlação e baixa eficiência.

O resultado obtido com BvrR – 2 foram de picos de dissociação limpos, pouco ruído, e bem estabelecidos, além de um bom coeficiente de correlação e eficiência.

Os resultados representativos da análise comparativa do gene VirB5 frente às espécies *B. Abortus* e *B. canis* utilizadas neste trabalho estão demonstrados na Figura 8.

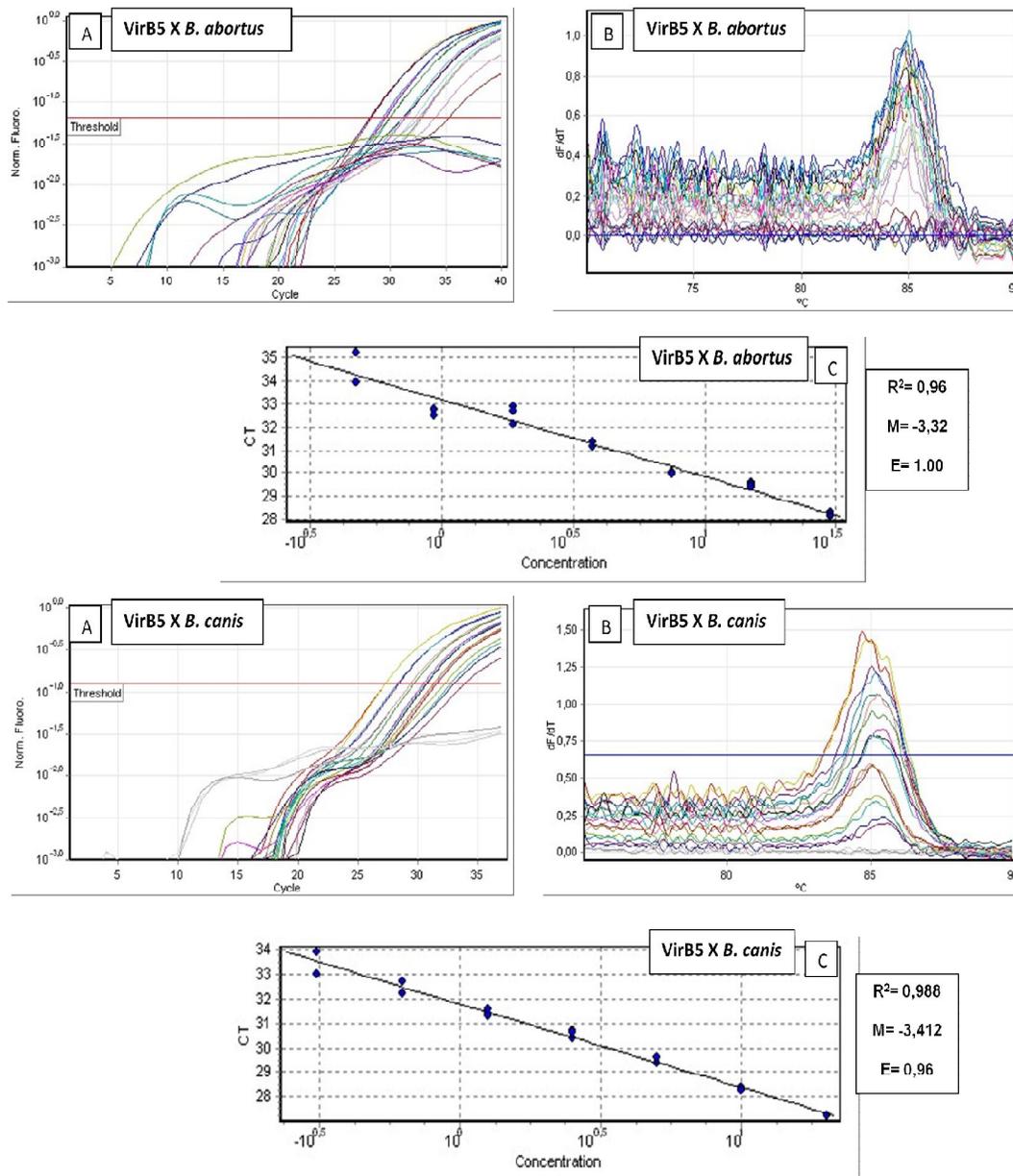


Figura 8: Análise do par de iniciadores do gene VirB5 utilizado frente à *B. abortus* 2308 e *B. canis*. (A) Amplificação resultante do desenho de iniciadores do gene VirB5 utilizados frente à *B. abortus* e *B. canis*, conforme especificado em cada figura, com detalhamento dos ciclos e estabelecimento do Threshold. As concentrações utilizadas de cDNA, para ambas as espécies bacterianas, foram de 20 ng a 0,3125 ng/reação, utilizando uma base de diluição 2; (B) Perfis das curvas de dissociação do gene VirB5 versus a *B. abortus* e *B. canis*, conforme especificado em cada figura; e (C) curva Standard relativa à espécie bacteriana, conforme especificado em cada figura, junto aos seus perfis de  $R^2$ , M e E.

A avaliação de VirB5 frente à *B. abortus* 2308 evidenciou que, apesar de o coeficiente de correlação e da eficiência apresentarem altos valores nas repetições efetuadas, como demonstrado no exemplo da Figura 8(B) para esta espécie, a especificidade da reação se revelou muito baixa e com muito ruído.

A utilização deste mesmo par de iniciadores, para o gene *VirB5* frente à *B. canis*, corrigiu esta falha e manteve o coeficiente de correlação e eficiência altos suficientemente para uma análise comparativa.

Os respectivos ensaios de VirB5 versus *B. abortus* 2308 apresentaram sempre as mesmas características diante da análise de reprodutibilidade. Apesar do fato citado anteriormente, a especificidade mínima da reação obtida para este gene foi até 1,25 ng/reação e que, apesar de repetidas análises, parecia estar inerente à resposta ao gene em específico, já que se apresentavam sempre da mesma forma em relação ao coeficiente de correlação, eficiência e ruído apresentado.

Os resultados representativos da análise comparativa do gene *VjbR* frente à *B. abortus* 2308 e *B. canis* estão demonstrados na Figura 9.

A avaliação de *VjbR* frente à *B. abortus* 2308 evidenciou eficiência, apresentando alto valor nas repetições efetuadas, e especificidade da reação alta e com pouco ruído. Como demonstrado no exemplo da Figura 9(B) para esta espécie, o coeficiente de correlação dos ensaios foi baixo.

A utilização deste mesmo par de iniciadores, para o gene *VjbR* frente à *B. canis*, manteve o coeficiente de correlação e eficiência altos suficientemente para uma análise comparativa.

Sua especificidade, entretanto, frente às duas espécies, *B. abortus* 2308 e *B. Canis*, foi somente até a concentração 0,625 ng/reação e 0,3125 ng/reação, respectivamente.

Apesar do discorrido acima, os picos de amplificação de *VjbR* frente à *B. abortus* 2308 ficaram mais evidentes, o que já era esperado.

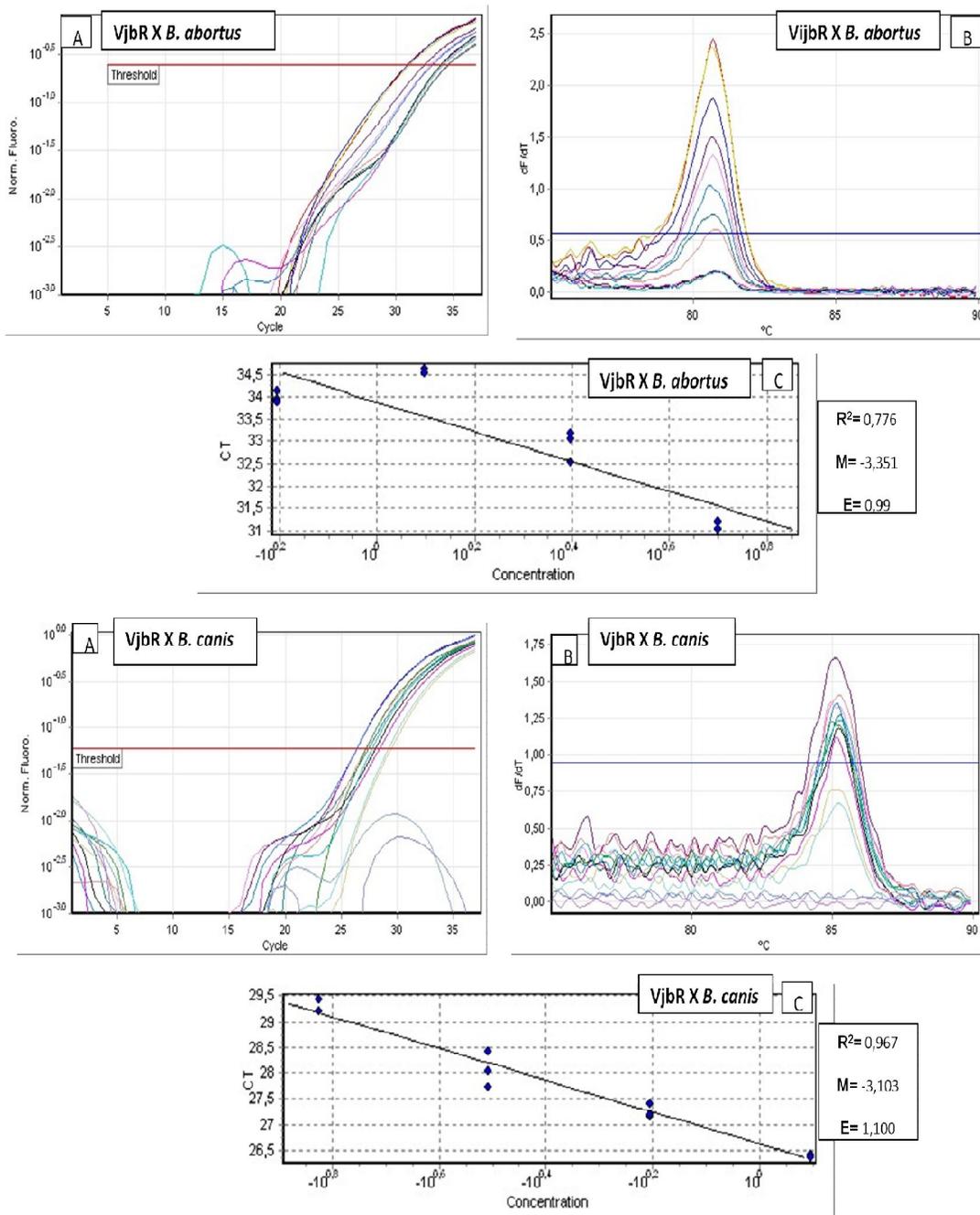


Figura 9: Análise do par de iniciadores do gene VjbR utilizados frente à *B. abortus* 2308 e *B. canis*. (A) Amplificação resultante do desenho de iniciadores do gene VjbR utilizados frente à *B. abortus* e *B. canis*, conforme especificado em cada figura, com detalhamento dos ciclos e estabelecimento do Threshold. As concentrações utilizadas de cDNA, para ambas as espécies bacterianas, foram de 5 ng a 0,3125 ng/reação, utilizando uma base de diluição 2; (B) Perfis das curvas de dissociação do gene VjbR versus a *B. abortus* e *B. canis*, conforme especificado em cada figura; e (C) curva Standard relativa à espécie

bacteriana, conforme especificado em cada figura, junto aos seus perfis de  $R^2$ , M e E.

### 5.5 - Análise de RT-PCR dos genes L7L12/BvrR -2/ Omp25/ ExoR -2

Os resultados representativos da análise do RT-PCR multiplex frente aos genes L7L12, BvrR (2), Omp25 e ExoR (2) frente à *B. abortus* 2308 está demonstrado na Figura 10.

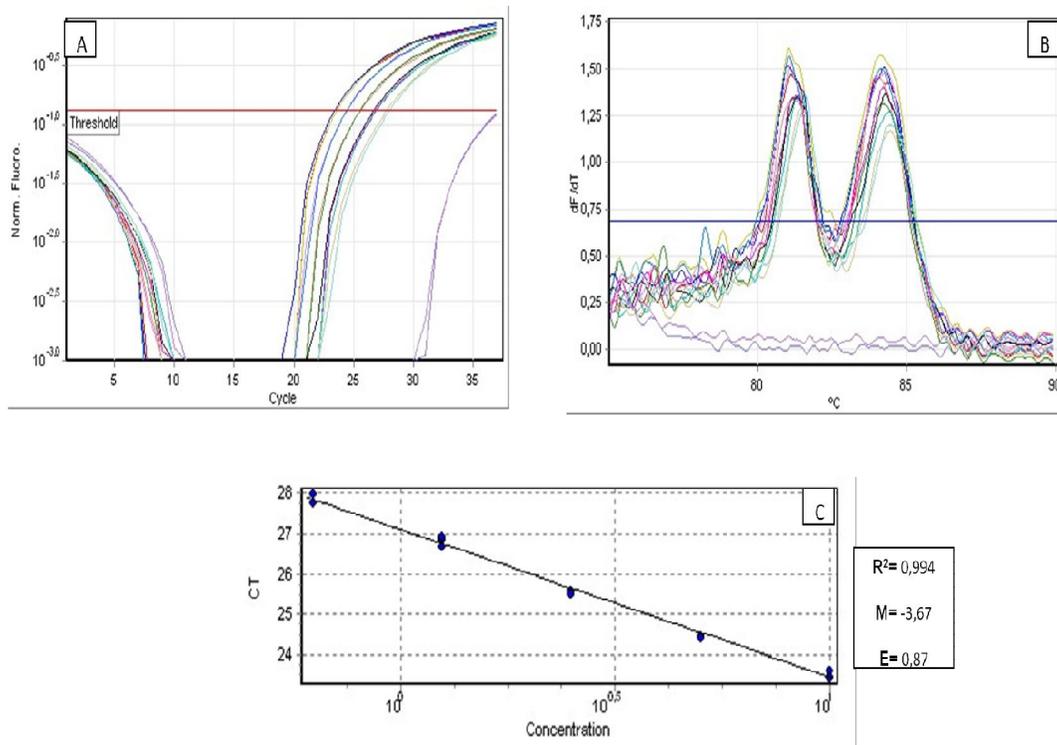


Figura 10: Análise dos pares de iniciadores dos genes L7L12, BvrR(2), Omp25 e ExoR(2) utilizados no ensaio do multiplex frente à *B. abortus* 2308. (A) Amplificação resultante do multiplex com detalhamento dos ciclos e estabelecimento do Threshold. As concentrações utilizadas de cDNA foram de 10 ng a 0,625 ng/reação, utilizando uma base de diluição 2; (B) Demonstração dos perfis das curvas de dissociação obtidos; (C) curva Standard relativa junto aos seus perfis de  $R^2$ , M e E.

O intervalo das concentrações utilizado, para este ensaio, variou de 10 ng a 0,625 ng/reação, utilizando uma base de diluição 2. Observa-se que todas as concentrações utilizadas tiveram um bom pico de amplificação, o que vai de acordo com o encontrado anteriormente nos ensaios únicos por gene.

A presença de ruído estava totalmente dentro dos limites esperados, o que corrobora a anteriormente citada. O coeficiente de correlação, eficiência e a inclinação da curva estão adequados, frente à análise feita dos quatro genes supracitados.

## 6 – Discussão

A curva de crescimento demonstrou acertadamente todas as fases, o que permitiu a escolha de um tempo específico de trabalho que foi de 17 horas, que, neste trabalho, fixou-se em meado da fase logarítmica.

A padronização do gene de referência ficou adequada diante de sua eficiência, coeficiente de correlação e CT obtidos. Segundo Schmittgen e Zakrajsek (2000), os pré-requisitos necessários, para que um gene possa ser considerado como referência, são que as condições do experimento não influenciem sua expressão. Em condições ideais, a eficiência da reação é 100% ( $E=1$ ), com a quantidade de produto gerado crescendo exponencialmente, dobrando a cada ciclo da PCR. Na prática, a eficiência da amplificação observada é frequentemente menor que 100%, podendo variar substancialmente (Sudgen e Winter, 2008). Fatos estes que corroboram a escolha do gene L7L12 neste trabalho e abre possibilidade para outros utilizarem o mesmo gene como referência para RT-PCR.

A eficiência da reação depende de muitos fatores, incluindo as sequências dos iniciadores, o tamanho dos amplicons, sua composição de Guanidina e Citosina (GC), e presença de impurezas nas amostras (Mcdowell et al., 1998). Esses fatores afetam o anelamento dos iniciadores, o ponto de dissociação da sequência-alvo e o processamento da enzima *Taq* polimerase (Livak e Schmittgen, 2001). As observações anteriores podem estar ligadas aos resultados obtidos, para os pares de iniciadores desenhados para os genes BvrR -1 e ExoR -1, além de servirem de explicação acerca dos pares de iniciadores desenhados, para os genes BvrR -2 e ExoR -2, serem adequados.

Para utilizar o método de CT comparativo, são necessária a otimização das reações, para que as eficiências fiquem próximas a 100%, e a certificação de que a eficiência da reação do gene de interesse seja similar à do gene controle interno (Livak e Schmittgen, 2001).

Entre as vantagens do método comparativo de CT, estão a facilidade de aplicação do método e a possibilidade de apresentação dos dados mediante o

aumento em vezes na expressão. As desvantagens do método comparativo de CT incluem a obrigação das eficiências de PCR ser muito próxima ou igual, o que requer uma otimização prévia (Schmittgen e Livak, 2008).

O uso de PCR em tempo real, para medir níveis de expressão de RNA mensageiros específicos, requer o isolamento de RNA, conversão do mesmo em cDNA pela enzima transcriptase reversa e, finalmente, a amplificação e detecção dos produtos gerados em tempo real.

Os pares de iniciadores BvrR – 1 foram analisados e não apresentaram características de eficiência e reprodutibilidade adequadas, apesar de apresentarem um coeficiente de correlação adequado, como demonstrado na Tabela 2.

A análise comparativa, entre os desenhos de *primer* do gene ExoR (1 e 2) presentes na Figura 7, utilizados neste trabalho, demonstraram bastante variabilidade em relação à especificidade da reação como demonstrado na Figura 7(B). Apesar de os dois pares de iniciadores mostrarem reações com picos únicos e sem ruído, o ExoR1 teve especificidade mínima até a concentração de 0,625 ng/reação, ao contrário de ExoR 2, que teve especificidade mínima até a concentração mínima utilizada de 0,3125 ng/reação. Porém, em relação à quantificação comparativa, demonstrada na Figura 7(A), não houve variabilidade.

Segundo Martínez-Núñez et al. (2010), embora os mutantes BvrR e BvrS mostrem níveis baixos das proteínas VirB1, VirB5, VirB8 e VirB9, as proteínas tiveram um aumento na expressão no mutante BvrR, complementado com um plasmídeo portador de um gene BvrR funcional. O aumento da expressão relativa ao RNAm, para o gene de VirB5, foi encontrado a partir das 20 horas de crescimento, o que indica a análise da expressão do mesmo no presente estudo.

Ainda segundo os autores acima relacionados, a quantificação de ARNm indicou que a influência no sistema de dois componentes BvrRS, no T4SS, VirB ocorre no nível da transcrição.

Acreditamos, portanto, que a padronização do gene virB5 deve acontecer na fase logarítmica tardia, diante do crescimento bacteriano e,

assim, utilizar este procedimento para as outras fases de crescimento da *Brucella abortus*, com finalidade de verificação de sua expressão no nível de RNAm.

## **7 - Conclusões**

Foi possível padronizar um protocolo, para determinar a expressão de genes de virulência, por High Resolution Melting RT-PCR.

Faz-se necessário uma avaliação e posterior melhoria da multiplex estabelecido em RT-PCR, principalmente no que tange aos genes e  $T_m$  avaliados.

Com os dados obtidos, foi possível estabelecer quantificação relativa de RNAm a partir das padronizações feitas com as diferentes concentrações, inclusive fixando limites mínimos e trabalho perante os genes trabalhados.

## 7 - Referências Bibliográficas

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. BRUCELLOSIS. In: ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 1: Bacterioses and Mycoses. 3 ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003, p. 40-67.

ACKERMANN, M.R., CHEVILLE, N.F. & Deyoe, B.L. (1988). Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet Pathol*, 25(1), 28-35.

AKITA, E.M.; NAKAI, S. (1992) Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. of Food Science*, v. 57, p. 629-634.

AKITA, E.M.; NAKAI, S. (1993) Comparison of four purification methods for the immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. of Immunol. Methods*, v. 160, p. 207-214.

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: as evaluation of the complement fixation test, serum agglutination, and rose bengal tests. *Australian Veterinary Journal*, v. 51, n. 2, p. 57-63, 1978.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Serological Methods. In: *Techniques for the brucellosis laboratories*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988, p.p. 63-136.

ARELLANO-REYNOSO, B.; LAPAQUE, N.; SALCEDO, S.; BRIONES, G.; CIOCCHINI, A.E.; UGALDE, R.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. & Gorvel, J. P. (2005). Cyclic  $\beta$ -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature immunology*, 6(6), 618-625.

ARENAS, G.N.; STASKEVICH, A.S.; ABALLAY, A.; MAYORGA, L.S. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 4255-4263, 2000.

ARIGITA, C.; KERSTEN, G.F.; HAZENDONK, T.; HENNINK, W.E.; CROMMELIN, D.J.; JISKOOT, W. Restored functional immunogenicity of purified meningococcal PorA by incorporation into liposomes. **Vaccine**, v. 21, n. 9-10, p. 950-60, Feb 14 2003.

ARNATO GAUCI, A.J. The return of brucellosis. *Malt. Med. J.* 1995: 7:7-8.

BADE, H.; STEGEMANN, H. (1984) Rapid method of extraction of antibodies from egg yolk. *J. of Immunol. Methods*, v. 72, p. 421-426.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; SOKER, N.G. (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 271-275.

BARQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D.S.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHACÓN-DÍAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYÓN, I. & MORENO, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PloS one*, 2(7), e631.

BATHEKE, W. BRUCELOSE. In: BEER, J. Doenças infecciosas em animais domésticos. Doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. São Paulo: Roca, v. 2, p. 44-160, 1988.

BOSCHIROLI, M. L.; FOULONGNE, V. & O'CALLAGHAN, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, 4(1), 58-64.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Planos e Programas. Área Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Instrução Normativa do Serviço Nacional Animal número 6 de oito de janeiro de 2004. Regulamento PNCEBT. Disponível em : [//www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 2004.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1-4, p. 435-436, 2002.

CARDOSO, P.G.; MACEDO, G.C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S.C. (2006) *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* 5:13.

CARLANDER, D.; STALBERG, J.; LARSSON, A. (1999) Chicken antibodies. A clinical Chemistry Perspective. *Upsala J. Med. Sci.* 104: 179-190.

CASCALES, E. & CHRISTIE, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 1(2), 137-149.

CELLI, J.; de CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D. M.; PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E. & GORVEL, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, 198(4), 545-556.

CHALGHOUNI, R.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. *Poultry Science*, v. 87, n. 1, p. 32-40, 2008.

CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; MERESSE, S.; DESJARDINS, M.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BADILLA, J.; GORVEL, J. P. & MORENO, E. (2002). Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, 4(10), 663-676.

CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; PARAMITHIOTIS, E. & MORENO, E. (2012). What Have we Learned from *Brucella* Proteomics? *Brucella Proteomics*, 103-131.

CHERWONOGRODZKY, J.W.; NIELSEN, K.H. *Brucella abortus* 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field-strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, p. 1120-1123, 1988.

CHOMKZYNSKI, P. (1993) A reagent for the step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques*, v. 15, p. 532-537

COMERCI, D.J.; MARTINEZ-LORENZO, M.J.; SIEIRA, R.; GORVEL, J.P. & UGALDE, R.A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol*, 3(3), 159-168.

Corbel, M.J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3(2), 213-221.

COSSEAU, C.; AZZI, A.; SMITH, K.; FREITAG, M.; MITTA, G.; GRUNAU, C. Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni*: Critical experimental parameters. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 166(1), p. 70-6, 2009.

CROSBY, M.J.; DÍAZ, D.; DÍAZ, O.O.; MONROY, A.G.; HERNANDEZ, M.; REYES, J. (1994) Alternativas de la inmunología como herramienta de investigación y diagnóstico: Generación, aislamiento y purificación en huevo de gallina. *Unisalle Dep. Quim. Biol. Diogenes*, v. 2, p. 137-149.

DAVISON, F.; MAGOR, K.E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. *Avian Immunology*, Elsevier, San Diego, EUA, 481p., 2008.

DE JONG, M.F.; SUN, Y.H.; DEN HARTIGH, A.B.; VAN DIJL, J.M. & TSOLIS, R.M. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucellatype IV secretion system. *Molecular microbiology*, 70(6), 1378-1396.

DEL RUE, R.M.; DESCHAMPS, C.; LEONARD, S.; NIJSKENS, C.; DANESE, I.; SCHAUS, J.M.; BONNOT, S.; FERROOZ, J.; TIBOR, A.; DE BOLLE, X. & LETESSON, J.J. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol*, 7(8), 1151-1161.

DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.E. Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in vero cells. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52:1658-64.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GERRERO, E.; POXTON, I.R. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microb. and Infect.* 4: 837-851.

FICHTALI, E.A.J.; CHARTER, K.V.L.; NAKAI, S. (1993) Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. *J. of Food Science*, v. 58, p. 1282-1285.

FREITAS, J.A.; SANTOS, E.J.C.; OLIVEIRA, J.P. (2002) Isolamento de *Brucella* SP. em produtos de origem animal e significado em saúde pública. *Revista de Ciências Agrárias de Belém-PA*, v. 37, p. 147-154.

FRETIN, D.; FAUCONNIER, A.; KÖHLER, S.; HALLING, S.; LÉONARD, S.; NIJSKENS, C.; FEROOZ, J.; LESTRATE, P.; DELRUE, R.M.; DANESE, I.; VANDENHAUTE, J.; TIBOR, A.; DEBOLLE, X. & LETESSON, J.J. (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular microbiology*, 7(5), 687-698.

GALLIEN, P.; DORN, C.; ALBAN, G.; STAAL, C.; PROTZ, D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet. Record*, v. 142, p. 512-514, 1998.

GAMENICSH, G.; TINI, M.; CHILOV, D.; KVIETIKOVA, I.; SRINIVAS, V.; CARO, J.; SPIELMANN, P. WENGER, R.H.; GASSMAN, M. (2000) General applications of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *The FASEB J.*, v. 13, p. 81-88.

GARCÍA-CARRILLO, C. Animal and human brucellosis in the Américas, Paris: Office Internationale Epizootique, 1990. 299 p.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HÜBSCHER, U. (1990) Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *The FASEB J.*, v. 4, p. 2528-2532.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, v. 36, p. 313-326, 2005.

GODFROID, J.; Brucellosis in wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 21 (2002) 277-286.

GODFROID, M.; SVENSSON, M.V.; CAMBIER, P.; UZUREAU, S.; MIRABELLA, A.; DE BOLLE, X.; VAN CUTSEM, P.; WIDMALM, G. & LETESSON, J.J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59(3), 364-377.

GORVEL, J.P. & MORENO, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 281-297.

GREINER, A.; DORIT, S.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods* 185, 123.

GRILLÓ, M.J.; MANTEROLA, L.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; MORIYÓN, I. & LÓPEZ-GOÑI, I. (2006). Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth *bvrS/bvrR* and rough *wbkA* mutants. *Vaccine*, 24(15), 2910-2916.

GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; VON EICHEL-STREIBER, C.; LÓPEZ-GOÑI, I.; THELESTAM, M.; ARVIDSON, S.; GORVEL, J.P. & MORENO, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem*, 276(48), 44435-44443.

GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; PARRA, A.; CLOECKAERT, A.; GARIN, J.; GORVEL, J.P.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. & LÓPEZ-GOÑI, I. (2002). The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12375-12380.

HASSI, A.; ASPÖCK, H. (1988) Purification of egg yolk immunoglobulins – A two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. of Immunol. Methods*, v. 110, p. 225-228.

HATTA, H.; SIM, J.S.; NAKAI, S. (1988) Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water soluble proteins. *J. of Food Science*, v. 53, p. 425-428.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG, *Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 3, p. 450-454, 1993.

HECK, F.C.; NIELSEN, K.H.; WILLIAMS, J.D.; CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G. Sensitivity of serological methods for detecting antibody in vaccinated and non-vaccinated *Brucella*-infected cows. (1986) *Australian Vet. J.* v. 61, p. 265-266.

HOOVER, D. L.; NIKOLICH, M.P.; IZADJOO, M.P.; BORSCHEL, R.H. & BHATTACHARJEE, A.K. (2004) Development of new *Brucella* vaccines by molecular methods En I. López-Goñi & I. Moriyón (Eds.), *Brucella: molecular and cellular biology* (pp. 369–402). Norwich, UK: Horizon Bioscience.

HORNITZKY, M.; SEARSON, J. (1986) The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. *Australian Vet. J.*, v. 63, p. 172-174.

JENESIUS, J.C.; ANDERSEN, I.; HAW, J.; CRONE, M.; KOCH, C. (1981) Egg: Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, v. 45, p. 63-68.

KIM, H.; NAKAI, S. (1996) Immunoglobulin separation from egg yolk: a serial filtration system. *J. of Food Science*, v. 61, p. 510-513.

KOHLER, S.; FOULONGNE, V.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; BOURG, G.; TEYSSIER, J.; RAMUZ, M. & LIAUTARD, J.P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15711-15716.

KOVACS-NOLAN, N.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 3, n. 12, p.163-182, 2012.

KWAN, L.; LI-CHAN, E.; HELBIG, N.; NAKAI, S. (1991) Fractionation of water-soluble and insoluble components from egg yolk with minimum use of organic solvents. *J. of Food Science*, v. 56, p. 1537-1541.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

LAMONTAGNE, J.; BUTLER, H.; CHAVES-OLARTE, E.; HUNTER, J.; SCHIRM, M.; PAQUET, C.; TIAN, M.; KEARNEY, P.; HAMAIDI, L.; CHELSKY, D.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. & PARAMITHIOTIS, E. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res*, 6(4), 1519-1529.

LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E.; DENIS, F.; BUTLER, H.; MICHAUD, J.F.; BOUCHER, L.; PEDRO, I.; VILLENEUVE, A.; SITNIKOV, D.; TRUDEL, K.; NASSIF, N.; BOUDJELTI, D.; TOMAKI, F.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; BRUNET, S.; COTE-MARTIN, A.; HUNTER, J.; MORENO, E.; & PARAMITHIOTIS, E. (2009). Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res*, 8(3), 1594-1609.

LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E. & GORVEL, J.P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 8(1), 60-66.

LARSSON, A.; KARISSON-PARRA, A.; SJÖQUIST, J. (1991) Use of chicken antibodies in enzyme immunoassay to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry*, v. 37, p. 411-414.

LARSSON, A.; KARISSON-PARRA, A.; SJÖQUIST, J. (1992) Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. of Immunol. Methods*, v. 156, p. 79-83.

LEE, E.N.; SUNWOO, H.H.; MENNINEN, K.; SIM, J.S. In vivo studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, v. 81, p. 632-641, 2002.

LEÓN, F.C. *Brucellosis ovina y caprina*. França: Office Internacional des Epizooties, 1994. v. 1, p. 451.

LEPE, J.A.; GUERRERO, F.J.; GARRIDO, A.; PEREA, R. (2001) Detección de *Brucella melitensis* por el sistema BACTEC 9050. *Enfermedades Infecciosas y microbiología Clínica*, v. 6, p. 267-269.

LESLIE, G.A.; CLEN, L.W. (1969) Phylogeny of immunoglobulin structure and function III. Immunoglobulin of the chicken, *J. Exp. Med.*, v. 130, p. 1337-1352.

LIOU, J.F.; CHANG, C.W.; TAILLIU, J.J.; YU, C.K.; LEI, H.Y.; CHEN, L.R.; TAI, C. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. *Vaccine*, v.28, n.51, p. 8189-8196, 2010.

LIVAK, K. e SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2\Delta\Delta CT$  method. *Methods*, v. 25(4), p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; SOLA-LANDA, A.; MORIYÓN, I. & MORENO, E. (2002). Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 329-339.

LÓPEZ-GOÑI, I. & MORIYÓN, I. (2004). *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. Pamplona, España: Horizon Bioscience.

MANTEROLA, L.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; BARQUERO-CALVO, E.; DE MIGUEL, M.J.; MORIYÓN, I.; GRILLÓ, M.J.; LÓPEZ-GOÑI, I. & MORENO, E. (2007). BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun*, 75(10), 4867-4874.

MANTEROLA, L.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; SOLA-LANDA, A.; WEISS, DAVID S.; KOCH, MICHEL H.J.; BRANDENBURG, K. & LÓPEZ-GOÑI, I. (2005). The Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS / BvrR Mutants Contains Lipid A Modifications and Has Higher Affinity for Bactericidal Cationic Peptides. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5631-5639.

MARTÍNEZ-NÚÑEZ, C.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; ALVARADO-GUILLÉN, F.; MORENO, E.; GUZMÁN-VERRI, C. & CHAVES-OLARTE, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 192(21), 5603-5608.

MARÍN, C.M.; ALABART, J.L.; BLASCO, J.M. (1996) Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. of Clinical Microbiol.*, v. 34, p. 426-428.

MA, S.; ZHANG, Y. Preparation of immunoglobulin y (IgY) against lipopolysaccharide using gel chromatography from the yolks of eggs laid by immunized hens. *The protein Journal*, v. 29, n. 7, p.475-480, 2010.

McCULLY, K.A.; MOK, CHI-CHING; COMMON, R.H. (1962) Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. *Canadian J. of Biochemistry and Physiology*, 40: 937-953.

MCDOWELL, D.G.; BURNS, N.A.; PARKES, H.C. Localized sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 26, p. 3340–3347, 1998.

McLAREN, R.D.; PROSSER, C.G.; GRIEVE, R.C.J.; BORISSENKO, M. (1994) The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chicken immunized with ovine  $\alpha$ -lactoalbumin. *J. of Immunol. Methods*, v. 177, p. 175-184.

MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular location of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Veterinary Pathology*, v. 26, p. 513-515, 1989.

MEKALANOS, J.J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol*, 174(1), 1-7.

MORENO, E. & GORVEL, J.P. (2004) Invasion, Intracellular Trafficking and Replication of *Brucella* Organisms in Professional and Non-Professional Phagocytes En I. López-Goñi & I. Moriyón (Eds.), *Brucella: Molecular and Cellular Biology* (pp. 280-306). Pamplona, España: Horizon Bioscience.

MORENO, E. & MORIYON, I. (2002). *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 1-3.

MORENO, E. & MORIYÓN, I. (2006) THE GENUS BRUCELLA EN M. DWORKIN; S. FALKOW; E. ROSENBERG; K.H. SCHLEIFER & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol. Vol 5, pp. 315-456). New York: Springer-Verlag.

NICOLETTI, P.L. (1990) Vaccination En K.H. NIELSEN & J.R. DUNCAN (Eds.), *Animal brucellosis* (pp. 283–299.). Boca Raton: CRC Press.

NIELSEN, K.; HECH, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assesment of antibody isotipes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 2, p. 197-204, 1984.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Archives of Medicine Veterinary*, v. 28, p. 9-17, 1995.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NOCOLETTI, P. (2004) Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:157:H7. *Vet. Microbiol.*, v. 100, p. 25-30.

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M.L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y. & RAMUZ, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular microbiology*, 33(6), 1210-1220.

OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Bovine Brucellosis. Paris, 2000. p. 328-345.

OIE. ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. Bovine brucellosis. Article 2.3.1.1. Terrestrial Animal Health Code 2005, Part 2, Section 2.3, carpther 2.3.1. Disponível em: <http://www.oie.int.htm>. Acesso em: 23 set. 2005.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Genebra, OMS, 1986, 149p. (Série de informes técnicos 740).

OLSEN, S.C.; BELLAIRE, B.H.; ROOP, R.M.; II & THOEN, C.O. (2010) BRUCELLA EN C.L. GYLES, J.F.; PRESCOTT, J.G.; SONGER & C.O. Thoen (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (Fourth Edition ed., pp. 675). 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA: Wiley-Blackwell.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Ginebra, OMS, 1986, 149p. (Série de informes técnicos 740).

PALACIOS-CHAVES, L.; CONDE-ALVAREZ, R.; GIL-RAMÍREZ, Y.; ZUNIGARIPA, A.; BARQUERO-CALVO, E.; CHACÓN-DÍAZ, C.; CHAVES-OLARTE, E.; ARCE-GORVEL, V.; GORVEL, J.P.; MORENO, E.; DE MIGUEL, M.J.; GRILLÓ, M.J.; MORIYÓN, I. & IRIARTE, M. (2011). *Brucella abortus* ornithine lipids are dispensable outer membrane components devoid of a marked pathogen-associated molecular pattern. *PLoS one*, 6(1), e16030.

PARMA, Y.R.; CHACANA, P.A.; ROGÉ, A.; KAHL, A.; CANGELOSI, A.; GEOGHEGAN, P.; LUCCHESI, P.M.A.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.E. Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon*, n. 58, n. 4, p. 380-388, 2011.

PATTERSON, R.; YOUNGNER, J.S.; WEIGLE, W.O.; DIXON, F.J. (1962a) Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. of Immunology*, v. 89, p. 272-278.

PATTERSON, R.; YOUNGNER, J.S.; WEIGLE, W.O.; DIXON, F.J. (1962b) The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. *The J. of General Physiology*, v. 45, p. 501-513.

PAULIN, L.M.S. O combate à brucelose bovina. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PAULIN, L.M.S.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 4, p. 41-47, 2002.

PAULIN, L.M.S. ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES POR *Brucella abortus* em Búfalos (*Bubalus bubalis*). Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006, 92p.

PIZARRO-CERDÁ, J.; MÉRESSE, S.; PARTON, R.G.; VAN DER GOOT, G.; SOLA-LANDA, A.; LOPEZ-GOÑI, I.; MORENO, E. & GORVEL, J.P. (1998a). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity*, 66(12), 5711-5724.

PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E. & GORVEL, J.P. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect*, 2(7), 829-835.

PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; MEGE, J. L. & GORVEL, J. P. (1998b). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infection and Immunity*, 66(5), 2387-2392.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. (2002) Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 90, p. 55-61.

POLSON, A.; VON WECHMAR, M.B.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1980) Isolation of viral IgY antibodies from egg yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, v. 9, p. 475-493.

PORTE, F.; LIAUTARD, J.P. & KÖHLER, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 67(8), 4041-4047.

QU, J.X.; LIN, Y.H.; MA, R.S.; WANG, H. Immunoaffinity purification of polypeptide proteins against *Plasmodium falciparum* with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. *Protein Expression and Purification*, v. 75, n. 2, p. 225-229, 2011.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolf publishing, 1994, 648p.

RAMBOW-LARSEN, A.A.; RAJASHEKARA, G.; PETERSEN, E. & SPLITTER, G. (2008). Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol*, 190(9), 3274-3282.

REMFRY, J. (1987) Ethical aspects of animal experimentation. In: Laboratory animals: an introduction for new experimenters (Tuffery, A.A. Ed.) New York. Interscience, p. 5-9.

RITCHIE, J.A. (2011). *Brucella abortus intracellular survival and intercellular trafficking*. (Master of Science), Iowa State University, Ames, Iowa. (Paper 1016)

RICHTZENHAIN, L.J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S.A.; HIGA, Z.M.M.; SCARCELLI, E.P.; GENOVEZ, M.E. (2002) A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet. Microbiol.*, v. 87, p. 139-147.

ROSE, M.E.; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. (1974) Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, v. 4, p. 521-523.

ROOP, R.M.; 2nd, Gee, J.M.; ROBERTSON, G.T.; RICHARDSON, J.M.; NG, W.L. & WINKLER, M.E. (2003). *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol*, 57, 57-76.

ROZEN, S. e SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

ROTZ, L.D.; KHAN, A.S.; LILLIBRIDGE, S.R.; OSTROFF, S.M. & HUGHES, J.M. (2002). Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis*, 8(2), 225-230.

SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.; BAKER, R. Is the erythritol the causa of abortion by brucellosis? In: CONGRESSE PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. 1996 Campo Grande. Anais... p. 34, RES. 491.

SANGARI, F. and J. AGUERO. 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb. Pathog.* 11: 443-446.

SCHADE, R.; ATACK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSON, A.; POLLMANN W.; van REGENMORTEL, M.; RUKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY – The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *ATLA*, v. 24, p. 925-934, 1996.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ATLA*, v. 33, n. 2, p. 129-154, 2005.

SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N. & CORBEL, M.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90(1-4), 479-496.

SCHMITTGEN, T. e ZAKRAJSEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods*, v. 46(1-2), p. 69-81, 2000.

SCHMITTGEN, T. e LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3(6), p. 1101-1108, 2008.

SHARMA, J.M. (1997) The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet. Hun*, vol. 45, p. 229-238.

SHEN, X.; LAGERGARD, T.; YANG, Y.; LINDBLAD, M.; FREDRIKSSON, M.; HOLMGREN, J. (2001) Preparation and preclinical evaluation of experimental group B streptococcus type III polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine for intranasal immunization. *Vaccine*, v. 19, p. 850-861.

SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILLÓ, M.J.; MORENO, E.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J.M.; GORVEL, J.P. & LÓPEZ-GOÑI, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular microbiology*, 29(1), 125-138.

STACK, J.A.; HARRISON, M.; PERRETT, L.L. (2002) Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. *J. of Applied Microbiol.*, v. 92, p. 724-728.

STOCK, J.B.; SURETTE, M.G.; LEVIT, M. & PARK, P. (1995) Two component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanism of catalysis En J. A. Hoch & T. J. Silhavy (Eds.), *Two-component Signal Transduction*. Washington, DC: ASM Press.

SUGDEN, D. e WINTER, P. *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press: Springer, 2008.

TAMINIAU, B.; DAYKIN, M.; SWIFT, S.; BOSCHIROLI, M.L.; TIBOR, A.; LESTRATE, P.; DE BOLLE, X.; O'CALLAGHAN, D.; WILLIAMS, P. & LETESSON, J.J. (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun*, 70(6), 3004-3011.

TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. (1979) Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. of Nat. Acad. of Sci. USA*, 76: 4350-4354.

VEGA, C.; BOK, M.; CHACANA, P.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F.; PARRENÖ, V. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 142, n. 3-4, p. 156-169, 2011.

UZUREAU, S., GODEFROID, M., DESCHAMPS, C., LEMAIRE, J., DE BOLLE, X. & LETESSON, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol*, 189(16), 6035-6047.

UZUREAU, S.; LEMAIRE, J.; DELAIVE, E.; DIEU, M.; GAIGNEAUX, A.; RAES, M.; DE BOLLE, X & LETESSON, J.J. (2010). Global Analysis of Quorum Sensing Targets in the Intracellular Pathogen *Brucella melitensis* 16 M research articles. *Journal of Proteome Research*, 9(6), 3200-3217.

VIADAS, C.; RODRÍGUEZ, M. C.; SANGARI, F.J.; GORVEL, J.P.; GARCIA-LOBO, J.M. & LOPEZ-GONI, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PloS one*, 5(4), e10216.

WANG, Y.; CHEN, Z.; QIAO, F.; ZHONG, Z.; XU, J.; WANG, Z.; DU, X.; QU, Q.; YUAN, J.; JIA, L.; SONG, H.; SUN, Y. & HUANG, L. (2010). The type IV

secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 303(1), 92-100.

WARR, G.W.; MAGOR, K.E.; HIGGINS, D.A. (1995) IgY: Clues to the origins of modern antibodies. Review. *Immunol. Today*, v. 16, p. 392-398.

WEN, J.; ZHAO, S.; HE, D.; YANG, Y.; LI, Y.; ZHU, S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral Research*, v. 93, n. 1, p. 154-159, 2012.

ZAITSEVA, M.; GOLDING, H.; MANISCHEWITZ, J.; WEBB, D.; GOLDING, B. (1996) *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin- 12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule I surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect Immun*. 64: 3109-3119.

## **Anexos**

## **Anexo 1**

**PROGRAMA DE LUZ - POEDEIRAS HYSEX BROWN**  
**Para: Luíze Garcia - Orientada do Prof. Folly**

IDADE ( Sem )	DATA	Nasc. ( horas )	Ocaso ( horas )	Total luz diária Natural ( horas )	Aumento Fotoperíodo	Total luz diária c/ Estímulo na semana	Controle do Timer	
							Ligar	Desligar
> 16	30/7/09						☺	☹
> 17	6/8/09						☺	☹
> 18	13/8/09						☺	☹
> 19	20/8/09						☺	☹
> 20 (20%)	27/8/09	6:08	17:41	11:33	00:15	11:48	17:45	18:00
> 21	3/9/09	6:02	17:43	11:41	00:15	11:56	17:45	18:15
> 22	10/9/09	5:55	17:45	11:50	00:15	12:05	17:45	18:30
> 23	17/9/09	5:48	17:48	12:00	00:15	12:15	17:45	18:45
24	24/9/09	5:41	17:50	12:09	00:30	12:39	17:45	19:15
25	1/10/09	5:34	17:52	12:18	00:30	12:48	17:45	19:45
26	8/10/09	5:27	17:54	12:27	00:30	12:57	17:45	20:15
27	15/10/09	5:21	17:57	12:36	00:30	13:06	17:45	20:45
28(Pico)	22/10/09	5:15	18:00	12:45	00:30	13:15	17:45	21:15
29-64	Manter as 17 h min de luz diária até o final do ciclo de postura							

OBSERVAÇÕES:

03:30

16:15

Total de horas de luz no pico de produção

- 1- Nunca permitir que o máximo do fotoperíodo seja diminuído durante o período de produção
- 2- Em dias nublados com baixa incidência luminosa, as luzes deverão serem acessas também durante o dia.

Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal  
 Prof. Humberto P. Couto

30/07/09

## **Anexo 2**

ROC		Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
Sensitivity & Specificity						
1	> -0.03185	100.0	85.75% to 100.0%	4.167	0.1054% to 21.12%	1.04
2	> -0.02408	100.0	85.75% to 100.0%	8.333	1.026% to 27.00%	1.09
3	> -0.006925	100.0	85.75% to 100.0%	12.50	2.656% to 32.36%	1.14
4	> 0.0114	100.0	85.75% to 100.0%	16.67	4.735% to 37.38%	1.20
5	> 0.01703	100.0	85.75% to 100.0%	20.83	7.132% to 42.15%	1.26
6	> 0.01885	100.0	85.75% to 100.0%	25.00	9.773% to 46.71%	1.33
7	> 0.02093	100.0	85.75% to 100.0%	29.17	12.62% to 51.09%	1.41
8	> 0.02168	100.0	85.75% to 100.0%	33.33	15.63% to 55.32%	1.50
9	> 0.0226	100.0	85.75% to 100.0%	37.50	18.80% to 59.41%	1.60
10	> 0.02493	100.0	85.75% to 100.0%	41.67	22.11% to 63.36%	1.71
11	> 0.02983	100.0	85.75% to 100.0%	45.83	25.55% to 67.18%	1.85
12	> 0.03428	100.0	85.75% to 100.0%	50.00	29.12% to 70.88%	2.00
13	> 0.0402	100.0	85.75% to 100.0%	54.17	32.82% to 74.45%	2.18
14	> 0.0486	100.0	85.75% to 100.0%	58.33	36.64% to 77.89%	2.40
15	> 0.05898	100.0	85.75% to 100.0%	62.50	40.59% to 81.20%	2.67
16	> 0.06655	100.0	85.75% to 100.0%	66.67	44.68% to 84.37%	3.00
17	> 0.06878	95.83	78.88% to 99.89%	66.67	44.68% to 84.37%	2.88
18	> 0.07248	95.83	78.88% to 99.89%	70.83	48.91% to 87.38%	3.29
19	> 0.07793	95.83	78.88% to 99.89%	75.00	53.29% to 90.23%	3.83
20	> 0.08798	95.83	78.88% to 99.89%	79.17	57.85% to 92.87%	4.60
21	> 0.1075	91.67	73.00% to 98.97%	79.17	57.85% to 92.87%	4.40
22	> 0.1271	87.50	67.64% to 97.34%	79.17	57.85% to 92.87%	4.20
23	> 0.1355	87.50	67.64% to 97.34%	83.33	62.62% to 95.26%	5.25
24	> 0.1384	83.33	62.62% to 95.26%	83.33	62.62% to 95.26%	5.00
25	> 0.1460	83.33	62.62% to 95.26%	87.50	67.64% to 97.34%	6.67
26	> 0.1602	83.33	62.62% to 95.26%	91.67	73.00% to 98.97%	10.00
27	> 0.1754	79.17	57.85% to 92.87%	91.67	73.00% to 98.97%	9.50
28	> 0.2262	75.00	53.29% to 90.23%	91.67	73.00% to 98.97%	9.00
29	> 0.2786	70.83	48.91% to 87.38%	91.67	73.00% to 98.97%	8.50
30	> 0.2942	66.67	44.68% to 84.37%	91.67	73.00% to 98.97%	8.00
31	> 0.3143	62.50	40.59% to 81.20%	91.67	73.00% to 98.97%	7.50
32	> 0.3358	58.33	36.64% to 77.89%	91.67	73.00% to 98.97%	7.00
33	> 0.3683	54.17	32.82% to 74.45%	91.67	73.00% to 98.97%	6.50
34	> 0.3980	54.17	32.82% to 74.45%	95.83	78.88% to 99.89%	13.00
35	> 0.4087	50.00	29.12% to 70.88%	95.83	78.88% to 99.89%	12.00
36	> 0.4220	45.83	25.55% to 67.18%	95.83	78.88% to 99.89%	11.00
37	> 0.4322	41.67	22.11% to 63.36%	95.83	78.88% to 99.89%	10.00
38	> 0.4455	41.67	22.11% to 63.36%	100.0	85.75% to 100.0%	
39	> 0.4640	37.50	18.80% to 59.41%	100.0	85.75% to 100.0%	
40	> 0.5074	33.33	15.63% to 55.32%	100.0	85.75% to 100.0%	
41	> 0.5605	29.17	12.62% to 51.09%	100.0	85.75% to 100.0%	
42	> 0.5954	25.00	9.773% to 46.71%	100.0	85.75% to 100.0%	
43	> 0.6491	20.83	7.132% to 42.15%	100.0	85.75% to 100.0%	
44	> 0.6896	16.67	4.735% to 37.38%	100.0	85.75% to 100.0%	
45	> 0.6957	12.50	2.656% to 32.36%	100.0	85.75% to 100.0%	
46	> 0.6990	8.333	1.026% to 27.00%	100.0	85.75% to 100.0%	
47	> 0.7777	4.167	0.1054% to 21.12%	100.0	85.75% to 100.0%	

Project2:ROC of Data 1:ROC curve - Mon Oct 22 17:16:04 2012

	X		A	
	100% - Specificity%		Sensitivity%	
	X	Y		
1	95.833	100.000		
2	91.667	100.000		
3	87.500	100.000		
4	83.333	100.000		
5	79.167	100.000		
6	75.000	100.000		
7	70.833	100.000		
8	66.667	100.000		
9	62.500	100.000		
10	58.333	100.000		
11	54.167	100.000		
12	50.000	100.000		
13	45.833	100.000		
14	41.667	100.000		
15	37.500	100.000		
16	33.333	100.000		
17	33.333	95.833		
18	29.167	95.833		
19	25.000	95.833		
20	20.833	95.833		
21	20.833	91.667		
22	20.833	87.500		
23	16.667	87.500		
24	16.667	83.333		
25	12.500	83.333		
26	8.333	83.333		
27	8.333	79.167		
28	8.333	75.000		
29	8.333	70.833		
30	8.333	66.667		
31	8.333	62.500		
32	8.333	58.333		
33	8.333	54.167		
34	4.167	54.167		
35	4.167	50.000		
36	4.167	45.833		
37	4.167	41.667		
38	0.000	41.667		
39	0.000	37.500		
40	0.000	33.333		
41	0.000	29.167		
42	0.000	25.000		
43	0.000	20.833		
44	0.000	16.667		
45	0.000	12.500		
46	0.000	8.333		
47	0.000	4.167		