

Desenvolvimento e avaliação de uma cepa *knockout* de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*¹

Fabiane G. de Souza^{2*}, Ana L.A.R. Osório², Bárbara G. Csordas², Rafael Q. Prado³, Carina Elisei³, Cleber O. Soares³, Flávio R. Araújo³, Stênio P. Fragoso⁴ e Grácia M.S. Rosinha³

ABSTRACT.- Souza F.G., Osório A.L.A.R., Csordas B.G., Prado R.Q., Elisei C., Soares C.O., Araújo F.R., Fragoso S.P. & Rosinha G.M.S. 2009. [Development and evaluation of a strain of *Brucella abortus* gotten by the knockout of the *virB10* gene.] Desenvolvimento e avaliação de uma cepa *knockout* de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(11):943-950. Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil. E-mail: fabicientista@gmail.com

Brucella spp. are intracellular facultative gram-negative bacteria which are pathogenic for many species of mammals, causing brucellosis, a worldwide spread zoonosis. Therefore the search for more efficient alternatives of control, as the development of new potential immunogens is necessary. In this study, we knocked out *virB10* from *Brucella abortus* S2308 strain, generating a mutant strain probably incapable to produce the corresponding native protein. The gene *virB10* is part of an operon that codifies for type IV secretion system, which is essential for the intracellular survival and multiplication of the bacteria in host cells. The knockout was carried through by the construction of the suicidal plasmid pBlue: *virB10::kan* and eletroporation in eletrocompetent cells of *B. abortus* S2308, leading to the exchange of the wild gene for the interrupted gene, containing the gene of resistance to kanamycin, for double homologous recombination. BALB/c mice were inoculated with S19, RB-51, $\Delta virB10$ strains of *B. abortus* and S2308 wild strain; the results demonstrated that the BALB/c mice inoculated with S19 and BALB/c mice inoculated with S2308 presented faster fall of trend line, when compared with the too much groups, for bacterial recovery (BR) and splenic weight (EW) respectively. The groups that received $\Delta virB10$ S2308 *B. abortus* and RB-51 demonstrated similar behavior for both the characteristics. In the sixth week postinoculation, the results for BR (log UFC \pm standart deviations) and EW (splenic weight \pm standart deviations), respectively, showed: groups inoculated with strains S2308 (4,44 \pm 1,97 and 0,44 \pm 0,11), S19 (1,83 \pm 2,54 and 0,31 \pm 0,04), RB-51 (0,00 \pm 0,00 and 0,20 \pm 0,01) and $\Delta virB10$ S2308 (1,43 \pm 1,25 and 0,19 \pm 0,03). Considered the bacterial clearance, all the groups differed statistical from the group that received S2308 ($p < 0,0001$), the group inoculated with $\Delta virB10$ S2308 *B. abortus* was similar to the S19 group ($p = 0,4302$) and different of group RB-51 ($p = 0,0063$). The evaluation of the persistence of the strains showed that *virB10* is essential for the maintenance of the virulence. These results support other studies concerning the immunogenic potential of this mutant strain.

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

¹ Recebido em 28 de março de 2009.

Aceito para publicação em 10 de agosto de 2009.

² Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Felinto Muller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil. *Autor para correspondência: fabicientista@gmail.com

³ Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km 4, Cx. Postal 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brasil.

⁴ Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba (CIC), Curitiba, PR 81350-010, Brasil.

RESUMO. - *Brucella* spp. são bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas que são patogênicas para muitas espécies de mamíferos causando a brucelose, uma zoonose difundida mundialmente. Por isso a busca de alternativas de controle mais eficientes se faz necessário como o desenvolvimento de novas cepas que possam ser testadas como potenciais imunógenos. Neste estudo realizou-se a deleção do gene *virB10* da cepa S2308 de *Brucella abortus* gerando uma cepa *knockout* provavelmente incapaz de produzir a proteína nativa correspondente. O gene *virB10* faz parte de um *operon* que codifica para um sistema de secreção do tipo IV, essencial para a sobrevivência intracelular e multiplicação da bactéria em células hospedeiras. A deleção foi realizada pela construção do plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* e eletroporação deste em células eletrocompetentes de *B. abortus* S2308, ocorrendo a troca do gene selvagem pelo gene interrompido, com o gene de resistência a canamicina, por recombinação homóloga dupla. Camundongos BALB/c foram inoculados com as cepas S19, RB-51, Δ *virB10* de *B. abortus* e *B. abortus* S2308 selvagem; os resultados demonstraram que camundongos BALB/c inoculados com S19 e camundongos BALB/c inoculados com S2308 apresentaram queda mais rápida de linha de tendência, quando comparadas aos demais grupos, para recuperação bacteriana (RB) e peso esplênico (PE) respectivamente. Os grupos que receberam Δ *virB10* S2308 de *B. abortus* e RB-51 demonstraram comportamento semelhante para ambas as características. Na sexta semana após a inoculação, os resultados para RB (log de UFC \pm desvio padrão) e PE (peso esplênico \pm desvio padrão), respectivamente, mostraram: grupos inoculados com as cepas S2308 (4,44 \pm 1,97 e 0,44 \pm 0,11), S19 (1,83 \pm 2,54 e 0,31 \pm 0,04), RB-51 (0,00 \pm 0,00 e 0,20 \pm 0,01) e Δ *virB10* S2308 (1,43 \pm 1,25 e 0,19 \pm 0,03). Considerado o *clearance* bacteriano, todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo que recebeu S2308 ($p < 0,0001$), o grupo inoculado com Δ *virB10* S2308 de *B. abortus* foi semelhante ao grupo S19 ($p = 0,4302$) e diferente do grupo RB-51 ($p = 0,0063$). A avaliação da persistência revelou que o gene *virB10* é essencial para a manutenção da virulência da bactéria. Os resultados obtidos possibilitarão que outras pesquisas sejam realizadas avaliando o potencial imunogênico desta cepa mutante.

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

INTRODUÇÃO

Brucella spp. são bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas que são patogênicas para muitas espécies de mamíferos incluindo o homem e que causam uma doença infecciosa crônica conhecida como brucelose, importante zoonose difundida mundialmente (Corbel 1997). Em humanos, a brucelose é uma doença debilitante caracterizada por diversas manifestações patológicas como febre ondulante, complicações osteoarticulares, endocardites e distúrbios neurológicos severos. Em ani-

mais domésticos como bovinos, caprinos e ovinos a manifestação patológica proeminente é o aborto em fêmeas prenhes, devido a colonização da placenta, tecidos fetais e órgãos sexuais, e esterilidade em machos (Nicoletti 1989). Em bovinos a brucelose é causada por *Brucella melitensis*, biovar Abortus (= *Brucella abortus*) (Verguer et al. 1985). Em *Brucella* spp. a virulência está associada com a capacidade de multiplicação dentro das células hospedeiras. A sobrevivência e a multiplicação de *Brucella* spp. dependem eficientemente de evitar a fusão do fagossomo contendo a bactéria com o lisossomo, e a replicação ocorre em vesículas do retículo endoplasmático. Os produtos gênicos que permitem *Brucella* spp. evadir e alcançar um nicho de replicação intracelular apropriado têm sido identificados (Pizarro-Cerdá et al. 1998).

As medidas de controle contra esta enfermidade baseiam-se no diagnóstico, eliminação dos animais infectados e vacinação. A vacinação contra infecções causadas por *Brucella* spp. é feita pela administração das cepas lisas atenuadas S19 de *B. abortus* e Rev.1 de *B. melitensis*. A cepa rugosa RB51 de *B. abortus* utilizada por EUA, Chile e Uruguai, atualmente foi também testada e aprovada para uso no Brasil. Porém esta cepa tem a desvantagem de ser resistente a rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (Poester et al. 2006). A cepa S19 de *B. abortus* é efetiva contra a infecção por *B. abortus* em bovinos e a cepa Rev.1 de *B. melitensis* é efetiva contra a infecção por *B. melitensis* e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Porém, ambas as vacinas possuem desvantagens (Cheville et al. 1993). Em função dos fatos expostos, grupos de pesquisadores têm produzido organismos mutantes pela deleção de genes essenciais ao metabolismo ou replicação de *B. abortus*, com a intenção de obter um sistema de imunização alternativo mais eficiente (Canavessi et al. 2004, Miyoshi et al. 2007).

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

Rolán et al. (2009) em estudos com camundongos *Igh6*^{-/-} demonstraram que anticorpos não específicos podem reverter a deficiência desses camundongos no controle da replicação de mutantes *virB* sem, no entanto, afetar a cepa selvagem de *Brucella abortus*. Tais resultados sugerem que o sistema de secreção do tipo IV medeia a evasão de uma função natural anticorpo-dependente de *clearance* imune de *B. abortus* durante a persistência *in vivo*.

Cepas *knockouts* de *Brucella* spp., que apresentam deleções de genes os quais codificam um sistema de se-

creção do tipo IV, perdem a habilidade de sobreviver e multiplicar em macrófagos e células epiteliais (O'Collaghan et al. 1999, Foulongne et al. 2000). Em diferentes estudos, cepas *knockouts* para genes *virB* de *B. abortus* mostram ser incapazes de estabelecer uma infecção crônica em modelos com camundongos; resultados similares são encontrados em experimentos com *B. suis* (Boschioli et al. 2002, Hong et al. 2000). Apesar da existência de diversos trabalhos demonstrando o efeito da deleção de genes *virB* na capacidade infectante de *Brucella* spp., não há relatos da utilização de mutantes *virB* de *B. abortus* como potenciais imunógenos. A ausência do gene *virB10* em *B. abortus* diminui a capacidade do microrganismo replicar em macrófagos e, sobreviver em camundongos (Sieira et al. 2000). Neste estudo realizou-se o *knockout* do gene *virB10* do genoma de *B. abortus* e foi avaliada a virulência desta cepa em camundongos BALB/c comparando-a com a obtida pelas cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa selvagem S2308 de *B. abortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo

As cepas bacterianas e os plasmídeos utilizados neste estudo estão listados no Quadro 1. As cepas de *Brucella abortus* foram cultivadas em meio *Brucella Broth* (DIFCO) por três dias a 37°C. Quando necessário o meio foi suplementado com ampicilina ou canamicina nas concentrações de 100µg/mL e 25µg/mL, respectivamente. *Escherichia coli* XL1-Blue foi cultivada a 37°C em meio *Luria-Bertani* (DIFCO) contendo canamicina a 50µg/mL ou ampicilina a 100µg/mL quando necessário. Para o preparo de meios sólidos utilizou-se a suplementação com 1,5% de ágar bacteriológico. Quando necessário foi adicionado eritritol ao meio *Brucella Broth* (BB) ágar na concentração final de 0,1%.

Construção do plasmídeo suicida para o *knockout* do gene *virB10* de *Brucella abortus*

O plasmídeo suicida utilizado para a troca do gene selvagem *virB10* de *B. abortus* pelo gene mutado foi obtido da maneira

como se segue. Os *primers* utilizados no experimento foram desenhados utilizando o programa OLIGO (MS-DOS) tendo como base no DNA genômico de *Brucella abortus* visando a amplificação do fragmento de DNA correspondente ao gene *virB10*. Este gene, de 1167 pares de bases, foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico de *B. abortus* S2308; os *primers* utilizados foram: *virB10EcoF* (5' - GGC GAA TCC ATG ACA CAG GAA AAC ATT - 3') e *virB10HindR* (5' - GGC AAG CTT TCA CTT CGG TTT GAC ATC - 3'). O gene *virB10* amplificado foi então digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HindIII* e ligado no vetor pBlueScriptKS (Stratagene) previamente digerido com as mesmas enzimas; resultando em pBlue:*virB10* (Quadro 1). Para a realização do procedimento de subclonagem o plasmídeo pBlue:*virB10* foi digerido com a endonuclease de restrição *MfeI*, que após o corte gera um fragmento de DNA com uma extremidade compatível a gerada pela enzima *EcoRI*. O plasmídeo pUC4K foi digerido com a enzima *EcoRI* liberando um fragmento de aproximadamente 1,3 kb correspondente ao gene de resistência a canamicina. Este fragmento foi ligado ao plasmídeo pBlue:*virB10*, previamente digerido, resultando no plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* (Quadro 1) (Rosinha 2002).

Obtenção dos mutantes de *Brucella abortus* por recombinação homóloga dupla

Visando a obtenção de mutantes de *B. abortus* foram preparadas células eletrocompetentes de *B. abortus* S2308; com essa finalidade essa cepa de *Brucella abortus* foi cultivada em 200mL de meio *Brucella Broth* por aproximadamente seis horas a 37°C até atingir a fase log de crescimento (densidade óptica de 600nm, 0,4-0,6). As células bacterianas foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos, o *pellet* obtido foi lavado três vezes com água bi-destilada refrigerada contendo 10% de glicerol e ressuspendido em 0,65mL desta mesma solução. Por fim, alíquotas de 0,05mL foram estocadas imediatamente a -80°C. Cinco microgramas do plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* foram adicionadas a 50µL de células eletrocompetentes de *B. abortus* em cubetas estéreis para eletroporação de 0,2cm (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA*), e a eletroporação foi realizada com o aparato de transfecção *Micro Pulser II* (*Bio Rad Labora-*

Quadro 1. Cepas bacterianas e vetores usados neste estudo

Cepas e plasmídeos	Características	Fonte
Cepas de <i>Escherichia coli</i> <i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1</i> <i>ac[F' proAB lacIqZΔM15</i> <i>Tn10 (Tetr)]</i> ^(a)	Stratagene
Cepas de <i>Brucella abortus</i> <i>B. abortus</i> 2308 <i>B. abortus</i> D <i>virB10</i>	Cepa selvagem, lisa, virulenta <i>kan^r</i> ^(b) , mutante <i>virB10</i> de 2308	Estoque do laboratório Este estudo
Plasmídeos pBlueScript [®] KS pUC4K pBlue: <i>virB10</i>	ColE1 ^(a) , <i>Amp^r</i> , <i>kan^r</i> ^(b) pBlueScript [®] KS contendo o gene <i>virB10</i>	Stratagene GE Healthcare Este estudo
pBlue: <i>virB10:kan</i>	pBlue: <i>virB10</i> contendo o gene de canamicina	Este estudo

^(a) características de cepas laboratoriais que carregam mutações que auxiliam na propagação de plasmídeos.

^(b) *amp^r* - gene que confere resistência a ampicilina.
kan^r - gene que confere resistência a canamicina.

tories) a 25 μ F, 2,5 kV, e 400 Ω . Um mililitro de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM de NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM de glicose) foi adicionado, e as células foram colocadas para crescer a 37°C sob agitação constante por 16 horas e plaqueadas em meio BB ágar contendo 25 μ g/ml de canamicina. Após cinco dias de incubação a 37°C, as colônias crescidas foram repicadas em placas contendo meio de cultivo BB ágar acrescido de 25 μ g/mL de canamicina e 25 μ g/mL de ampicilina (Miyoshi et al. 2007).

Análise por Southern blot de *Brucella abortus* mutante

Com o intuito de comprovar geneticamente a troca ocorrida entre o gene *virB10* da cepa selvagem de *B. abortus* (S2308) e o gene *virB10* interrompido com o gene de canamicina, 10 μ g do DNA genômico isolado das cepas mutantes e selvagens de *B. abortus* foram digeridos com a enzima *EcoRV* e então colocados para migrar em gel de agarose a 1% para a realização da técnica de Southern blot (Miyoshi et al. 2007).

Avaliação da virulência da cepa mutante em camundongos BALB/c

A virulência da cepa mutante obtida foi determinada pela quantificação desta no baço de camundongos previamente infectados e pela avaliação da presença de alteração no peso dos baços. Camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade foram divididos em quatro grupos de oito camundongos cada, e infectados na região intraperitoneal com 1 x 10⁶ unidades formadoras de colônia (UFC) com as cepas S19, RB-51, S2308, *AvirB10* (mutante para o gene *virB10*), separadamente. Uma, três e seis semanas após a infecção, os animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus baços foram removidos, pesados e macerados em tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*, 137mM NaCl, 10mM Fosfato, 2,7mM KCl e pH de 7,4), com o auxílio de uma peneira de aço. As diluições seriadas 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ foram plaqueadas em meio BB canamicina para o grupo do mutante e em BB sem suplementações para o restante dos grupos. Três dias após a incubação em estufa a 37°C, o número de UFC de cada grupo foi determinado para cada animal. Os resultados foram expressos como a média do log de UFC de cada cepa de *B. abortus* utilizada (Rosinha 2002).

Análise estatística

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

RESULTADOS

Caracterização de *Brucella abortus* mutante obtida pela deleção do gene *virB10*

Cinco clones de ambos os fenótipos canamicina resistente (Kan^R) e ampicilina sensível (Amp^S) ou canamicina resistente (Kan^R) e ampicilina resistente (Amp^R) foram selecionados como colônias que sofreram recombinação homóloga dupla e simples, respectivamente. Deste modo foi obtida uma cepa mutante de *Brucella abortus* a partir da deleção do gene *virB10* da cepa selvagem *B. abortus* S2308. A mutação foi obtida por recombinação homóloga por troca do gene cromossomal utilizando o plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* (Fig.1). O DNA cromossomal digerido com a enzima de restrição *EcoRV*

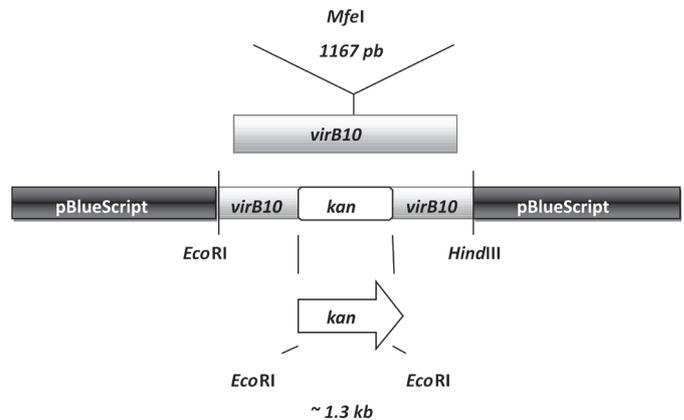


Fig.1. Representação esquemática do plasmídeo suicida pBlue:*virB10* contendo o gene de canamicina interrompendo o gene *virB10*.

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

Virulência da cepa mutante em camundongos BALB/c

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

Conforme descrito na metodologia, os camundongos tiveram seus baços pesados e os resultados obtidos foram avaliados (Quadro 2). Foi observada esplenomega-

Quadro 2. Peso esplênico (PE) e recuperação bacteriana (RB) no baço de camundongos BALB/c inoculados com a cepa mutante $\Delta virB10$ S2308 de *Brucella abortus*, a cepa virulenta S2308 e as cepas vacinais RB-51 e S19. Valores expressos como a média do log de UFC \pm desvio padrão (RB) e peso dos baços(em gramas) \pm desvio padrão (PE)

Inóculos	Semanas após a inoculação					
	1 ^a		3 ^a		6 ^a	
	PE (peso dos baços \pm desvio padrão)	RB (log de UFC \pm desvio padrão)	PE (peso dos baços \pm desvio padrão)	RB (log de UFC \pm desvio padrão)	PE (peso dos baços \pm desvio padrão)	RB (log de UFC \pm desvio padrão)
S2308	0,70 \pm 0,09	7,34 \pm 0,12	1,06 \pm 0,15	6,37 \pm 0,37	0,44 \pm 0,11	4,44 \pm 1,97
S19	0,33 \pm 0,07	7,39 \pm 0,21	0,87 \pm 0,23	6,12 \pm 0,17	0,31 \pm 0,04	1,83 \pm 2,54
RB-51	0,15 \pm 0,01	3,95 \pm 0,45	0,19 \pm 0,03	2,98 \pm 0,26	0,20 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
$\Delta virB10$ S2308	0,18 \pm 0,02	6,29 \pm 0,24	0,16 \pm 0,02	4,42 \pm 0,24	0,19 \pm 0,03	1,43 \pm 1,25

UFC = Unidade Formadora de Colônia. BALB/c = Linhagem de camundongos isogênicos.

lia nos animais que foram inoculados com a cepa virulenta S2308 de *B. abortus*.

Quando avaliados recuperação bacteriana e peso esplênico em função do tempo pós- inoculação observou-

se que os grupos apresentaram linhas de tendência diferenciadas. Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 1×10^6 UFC de cada inóculo já mencionado. As linhas de tendência expressas correspondem à média do peso dos baços (g) para cada grupo (n=8) $P < 0,05$ (Fig.2A) e à média do log de UFC para cada grupo (n=8) $P < 0,05$ (Fig.2B).

DISCUSSÃO

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

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

Neste estudo o gene *virB10* de *Brucella abortus* foi deletado por meio da construção de um plasmídeo suicida contendo o gene interrompido, incapaz de expressar o gene, o qual foi introduzido na cepa selvagem S2308 de *B. abortus* e por recombinação homóloga foi gerada uma

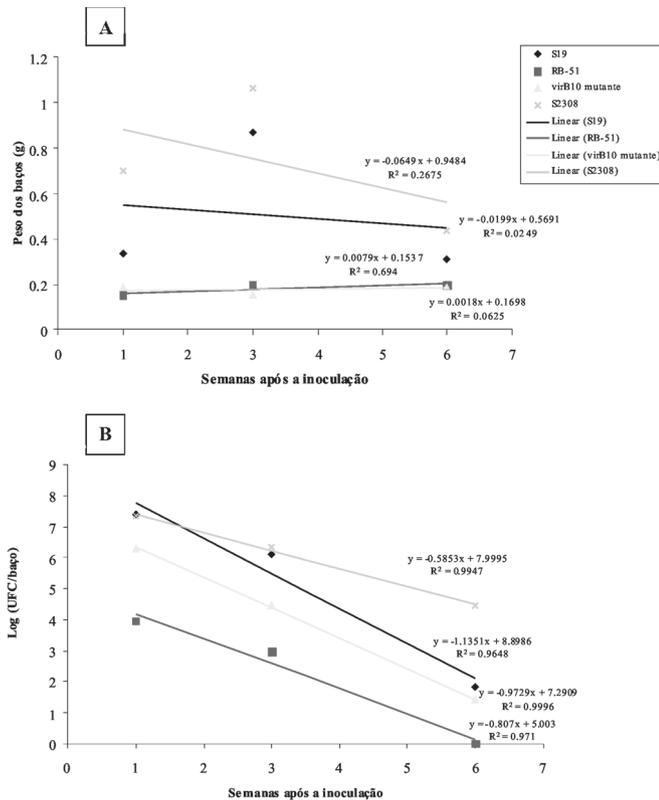


Fig.2. Tendências de peso esplênico (A) e recuperação das cepas (B) de *Brucella abortus* S2308 selvagem, cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa mutante $\Delta virB10$ de *B. abortus* S2308 no baço de camundongos BALB/c infectados uma, três e seis semanas após a inoculação. Fig. 3. Tendência de recuperação das cepas *Brucella abortus* 2308 selvagem, cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa mutante $\Delta virB10$ de *B. abortus* S2308 no baço de camundongos BALB/c infectados (Painel A) e tendência de peso esplênico destes grupos uma, três e seis semanas após a inoculação (Painel B). Os pontos no gráfico correspondem as médias dos grupos em cada intervalo de tempo analisado.

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

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

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

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

Uma semana após a infecção, comparando as cepas, $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus* e RB-51 apresentaram diferença estatística quando comparadas entre si e à cepa

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

Hartigh et al. (2004) visando determinar o modo como os genes *virB1* e *virB2* são necessários para a persistência de *B. abortus in vivo* testaram a habilidade de estabelecimento da infecção e persistência em camundongos BALB/c de mutantes polares e apolares para estes genes. A recuperação de UFC bacteriana foi observada uma, três e oito semanas após a inoculação. Uma semana após a infecção a cepa virulenta S2308 foi recuperada em números seis a oito vezes maiores que os mutantes polares para *virB1* e *virB2* e, mutante apolar *virB2*.

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

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

mo experimento apresentaram mais rápido *clearance*. Paulley et al. (2007) para avaliar a função potencial do gene *bhuA*, que expressa um transportador de grupo heme, na patogênese e no transporte de grupo heme durante a permanência em hospedeiros mamíferos avaliou as propriedades de virulência de mutantes para este gene em cultura de macrófagos murinos e também em camundongos BALB/c. Tanto em macrófagos quanto em camundongos os mutantes *bhuA* exibiram significativa atenuação quando comparados à cepa virulenta selvagem S2308.

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

O grupo inoculado com a cepa S19, quanto à recuperação bacteriana, apresentou queda mais rápida de persistência quando comparado aos demais grupos. Contudo esse comportamento não foi o mesmo para a média dos pesos dos baços dos animais inoculados, neste caso o grupo inoculado com a cepa selvagem S2308 foi o que apresentou linha de tendência com queda mais rápida (Fig.2A). Em ambos os casos, e com maior precisão para o peso esplênico, o grupo inoculado com $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus* apresentou linha de tendência com comportamento semelhante ao inoculado com a cepa vacinal RB-51.

Esta cepa $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus* futuramente poderá ser testada como nova cepa vacinal na busca de alternativas mais eficientes no controle da brucelose.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível a obtenção de cepas mutantes de *Brucella abortus* pelo *knockout* do gene *virB10*. A avaliação desta cepa em camundongos BALB/c comparando-a com a obtida pelas cepas vacinais S19 e RB-51 e, também com a cepa selvagem S2308 de *B. abortus* revelou que o gene *virB10* é essencial para a manutenção da virulência da bactéria.

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

REFERÊNCIAS

Baldwin C.L. 2002. Immune response overview. *Vet. Microbiol.* 90:365-366.

- Bishop G.C., Bosman P.P. & Herr S. 1994. Bovine Brucellosis, p.1053-1066. In: Coetzer J.A.N., Thomson G.R. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. University Press, College Station, Texas.
- Boschiroli M.L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevielle C., Liautard J.P., Ramuz M. & O'Collaghan D. 2002. The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci.* 99: 1544-1549.
- Canavessi A.M.O., Jerome H., Gatti N.L. & Splitter G.A. 2004. The role of integrase/recombinase *xerD* and monofunctional biosynthesis peptidoglycan transglycosylase genes in the pathogenicity of *Brucella abortus* infection *in vitro* and *in vivo*. *Microb. Pathog.* 37:241-251.
- Celli J. & Gorvel J. 2004. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:93-97.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jesen A.E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 54:1591-1597.
- Christie P.J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* 179:3085-3094.
- Comerci D.J., Martinez-Lorenzo M.J., Sieira R., Gorvel J.P. & Ugalde R.A. 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol.* 3:159-168.
- Corbel M.J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3:213-221.
- Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J. & Rappuoli R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284:1328-1333.
- Das A. & Xie Y.H. 1998. Construction of transposon Tn3PHOa: Its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol. Microbiol.* 14:405-414.
- Ding Z., Atmakuri K. & Christie P.J. 2003. The outers and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* 11:527-535.
- Foulongne V., Bourg G., Cazevielle C., Michaux-Charachon S. & O'Collaghan D. 2000. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* 68:1297-1303.
- Hartigh A.B. Den, Sun Y-H., Sondervan D., Heuvelmans N., Reinders M.O., Ficht T.A. & Tsois R.M. 2004. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 72:5143-5149.
- Hong P.C., Tsois R.M. & Ficht T.A. 2000. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.* 68:4102-4107.
- Kahl-McDonagh M.M. & Ficht T.A. 2006. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c. *Infect. Immun.* 74:4048-4057.
- Lapaque N., Moryon I., Moreno E. & Gorvel J.P. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:60-66.
- Miyoshi A., Rosinha G.M.S., Camargo I.L.B.C., Trant C.M.C., Cardoso F.C., Azevedo V. & Oliveira S.C. 2007. The role of the *vacB* gene in the pathogenesis of *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 9:375-381.
- Nicoletti P.L. 1989. Relationship between animal and human disease, p.41-51. In: Young E.J. & Corbel M.J. (Eds), *Brucellosis: Clinical and laboratory aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- O'Collaghan D., Cazevielle C., Allardet-Servent A., Boschiroli M.L., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y. & Ramuz M. 1999. A homologue of *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl

- type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33:1210-1220.
- Paulley J.T., Anderson E.S. & Roop II R.M. 2007. *Brucella abortus* Requires the Heme Transporter BhuA for Maintenance of Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 75:5248-5254.
- Pavelka Jr M.S. & Jacobs Jr W.R. 1999. Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J. Bacteriol.* 181:4780-4789.
- Pizarro-Cerdá J., Méresse S., Parton R.G., Goot G., Aola-Landa A., Lopez-Gofii I., Moreno E. & Gorvel J.P. 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non professional phagocytes. *Infect. Immun.* 66:5711-5724.
- Poester F.P., Gonçalves V.S.P., Paixão T.A., Santos R.L., Olsen S.C., Schurig G.G. & Lage A.P. 2006. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* 24:5327-5334.
- Rolán H.G., Xavier M.N., Santos R.L. & Tsolis R.M. 2009. Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus virB* mutant. *Infect. Immun.* 77:3004-3013.
- Rosinha G.M.S. 2002. Isolamento, identificação e avaliação do envolvimento dos genes *gap*, *pgk*, *tkl*, *vacB* e *exsA* da *Brucella abortus* na patogênese molecular e imunoproteção. Tese de Doutorado em Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 226p.
- SAS Institute 2005. Statistical Analysis System User's Guide. Version 9th ed. SAS Institute Inc., Cary p.5123.
- Sieira R., Comerci D.J., Sánchez D.O. & Ugalde R.A. 2000. A homologue of operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.* 182:4849-4855.
- Verguer J.M., Grimont F., Grimont P.A.D. & Grayon M. 1985. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:292-295.
- Watarai M., Makino S. & Shirahata T. 2002. Na essencial virulence protein of *Brucella abortus*, *virB4*, required na intact nucleoside-triphosphate-binding domain. *Microbiol.* 148:1439-1446.
- Wu Q., Jianwu P., Turse C. & Ficht T.A. 2006. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival, *BMC. Microbiology* 6:102.
- Yang X., Becker T., Walters N. & Pascual D.W. 2006. Deletion of *znuA* virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge. *Infect. Immun.* 74:3874-3879.