



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
ASSOCIADOS À BRUCELOSE BOVINA E SUAS APLICAÇÕES
DIAGNÓSTICAS E VACINAIS**

FABIANA DE ALMEIDA ARAÚJO SANTOS

UBERLÂNDIA - MG

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
ASSOCIADOS À BRUCELOSE BOVINA E SUAS APLICAÇÕES
DIAGNÓSTICAS E VACINAIS**

FABIANA DE ALMEIDA ARAÚJO SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética).**

UBERLÂNDIA - MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237c Santos, Fabiana de Almeida Araújo, 1983-
2011 Caracterização de peptídeos recombinantes associados à brucelose
bovina e suas aplicações diagnósticas e vacinais / Fabiana de Almeida
Araújo Santos. -- 2011.
102 f.: il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Brucelose em bovino - Diagnóstico - Teses.
3. Brucelose bovina - Vacina - Teses. 4. Peptídeos - Teses. I. Goulart
Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
III. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
ASSOCIADOS À BRUCELOSE BOVINA E SUAS APLICAÇÕES
DIAGNÓSTICAS E VACINAIS**

FABIANA DE ALMEIDA ARAÚJO SANTOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores:

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - UFMG-MG

Dr^a Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba - ICBIM-UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - ICBIM-UFU

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior - ICBIM-UFU

Prof^a Dr^a Tatiana Amabile de Campos - INGEB-UFU (Suplente)

Data da Defesa: 27/10/2011.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Luiz Ricardo Goulart

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida, me ajudando sempre a superar todos os medos e obstáculos que encontro em meu caminho, e me dando forças para procurar sempre seguir em frente e dar o meu melhor.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Marisa, que sempre me apoiou, incentivou e com muito amor torceu pelo meu sucesso!

Ao meu amor, Oscari Bruno I. R. Borges que a cada dia se torna mais importante na minha vida me fazendo muito feliz, e que soube compreender os momentos de ausência e cansaço, me apoiando e incentivando sempre! Te amo!

Aos meus animais de estimação, a Futrica que foi muito importante. O Snoopy, meu gato, que esteve presente em quase todos os momentos de escrita deste trabalho, mostrando ser muito companheiro e sempre me transmitindo paz. E a Pantera, minha “cachorrinha”, que apenas com cinco meses de vida já é extremamente importante, e tem sido minha “válvula de escape”, onde posso extravasar meus medos e angústias, e que me faz muito bem!

Aos médicos e fisioterapeutas que me ajudaram em um dos momentos mais difíceis da minha vida, tratando das minhas hérnias de disco.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela oportunidade, pelo estímulo, otimismo e confiança em mim depositada em todas as etapas deste trabalho, o que sem dúvida possibilitou meu crescimento pessoal e profissional! Muito obrigada Luiz por todos estes anos de trabalho e amizade!!!

Ao Carlos Prudencio e William Jardim que me convidaram para participar deste grupo e que foram idealizadores do projeto do Centro Colaborador.

A Prof^a Anna Monteiro por abraçar o projeto do Centro Colaborador, pela amizade e confiança. Muito obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia, Luciana Bastos, Juliana Franco, Patrícia Tieme, Carolina Reis, Robson, Karina, Mayara, Lara, Bruna, Cláudia, Thaise, Patrícia Terra, Angela, Eliza, Fausto, Ayla, Ana Carolina Siquieroli e Yara pela amizade e apoio que sempre me proporcionaram.

As amigas Emília, Léa e Tamiris, que sempre estavam prontas a me ajudar e ficar até altas horas no laboratório esperando bactérias... não é mesmo Emília?! Muito obrigada! Vocês são pessoas especiais!!!

A grande amiga Paula Souza, que pude conhecer melhor nesse último ano de dificuldades... muito obrigada por tudo!

Ao Luiz Carlos, meu psiquiatra de plantão... rrsrsrs... muito obrigada meu amigo!

Ao Prof. Carlos Ueira, que na ausência do Prof. Luiz cuidou muito bem do Laboratório e de todos nós. Muito obrigada pela amizade!

A Profª Vivian e ao Beto pela atenção e ajuda, foi fundamental!

A Valéria e a Zuleide pela amizade e por manter a limpeza e organização do Laboratório, vocês são essenciais!

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, em especial a Mariana, Jacqueline, João Helder, Pollyanna, Tatiane e Mariane, obrigada pela amizade e pelos ensinamentos.

A Profª Ana Graci e a aluna Ana Cristina do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia - UFU, meu muito obrigada.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, pela disponibilidade em colaborar neste trabalho e pela atenção que me foi dada sempre que precisei!

As pesquisadoras da UFMG, Telma, Elaine, Ana Paula e Juliana, muito obrigada pela ajuda e boa vontade!

Ao amigo Eduardo Lara, de BH, por estar sempre disponível para ajudar, sempre com muita dedicação! Muito obrigada!

Aos professores do Laboratório de Imunoparasitologia da UFU, o Prof. Mineo, Prof. Tiago, Profª Deise e Prof. Jair meu muito obrigada pela confiança, pelo apoio e pelos ensinamentos!

A pesquisadora Ana Cláudia Pajuaba, por me dar total apoio, abraçando meu trabalho e me ajudando muito, tanto na execução dos experimentos como em todos os ensinamentos que me foi passado. Muito obrigada!

A todos os animais que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, sem eles nada teria sido possível.

A Direção, Professores e Funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica e a Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho!

As agências de fomento CAPES, CNPq e MAPA pelo auxílio financeiro.

*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que
minha vida é a maior empresa do mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões
e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua
alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “não”.
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

Fernando Pessoa

Índice

Apresentação	1
Capítulo I.....	2
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
1. Brucelose bovina	3
2. Epidemiologia da brucelose bovina no Brasil e seus impactos econômicos..	3
3. Etiologia	5
4. Características específicas da <i>Brucella abortus</i>	6
5. Patogenia.....	7
6. Sinais clínicos e patológicos	8
7. Resposta imune	9
8. Diagnóstico	10
8.1. Testes de triagem.....	12
8.2. Testes confirmatórios	13
8.3. Outros métodos de diagnóstico.....	16
9. Vacinas contra brucelose bovina	17
10. Descoberta de novos alvos biológicos para diagnóstico e vacina.....	20
10.1. <i>Phage Display</i>	20
10.2. Biossensores.....	25
11. Referências bibliográficas	27
Capítulo II.....	36
MIMETOPOS IMUNODOMINANTES ASSOCIADOS A RESPOSTA HUMORAL DE BOVINOS INFECTADOS COM <i>Brucella abortus</i> E APLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E VACINAIS	36
Resumo	37
1. Introdução	38
2. Material e Métodos	41
2.1. Obtenção das amostras de soro.....	41

2.3.	Acoplamento das IgGs nas microesferas proteína G	42
2.4.	Seleção dos Peptídeos Recombinantes.....	43
2.5.	Análise de dados <i>in Silico</i>	47
2.6.	<i>Screening Phage-ELISA</i>	48
2.7.	<i>Screening</i> com soro.....	49
2.8.	Preparação do peptídeo sintético	49
2.9.	Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos	50
2.10.	Análise estatística.....	51
2.11.	Construção de sensor eletroquímico	52
2.12.	Preparação do antígeno solúvel de lisado total de <i>Brucella abortus</i> ...	54
2.13.	Animais e imunização.....	55
2.14.	Avaliação da resposta imune humoral.....	56
2.15.	Análise estatística.....	58
2.16.	Normas de biossegurança e manipulação de animais	58
3.	Resultados	59
3.1.	Seleção de peptídeos recombinantes	59
3.2.	<i>Screening Phage-ELISA</i>	61
3.3.	Análise de dados <i>in silico</i>	63
3.4.	Peptídeos sintéticos	64
3.5.	Sensor eletroquímico.....	67
3.6.	Resposta imune humoral após imunização.....	68
3.7.	Resposta imune celular: análise de citocinas.....	70
4.	Discussão	72
4.1.	Seleção e abordagem diagnóstica	72
4.2.	Abordagem vacinal.....	74
5.	Conclusão	77
6.	Referências bibliográficas	78

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1: Divisão dos grupos para as imunizações.....55

Tabela 2: Taxas de enriquecimento observadas durante as seleções biológicas utilizando biblioteca Ph.D.-C7C.....60

Tabela 3: Frequência dos clones de fagos sequenciados.....61

Tabela 4: Sensibilidade, especificidade e acurácia obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-*Brucella abortus* em amostras de soro, utilizando os peptídeos sintéticos.....66

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Esquema representativo de um bacteriófago filamentosos¹.....21

Figura 2: Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e adição da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção em *E. coli* ER2738, titulação, amplificação dos fagos eluídos e sequenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo (Autoria própria).....23

Figura 3: Esquema geral de um biossensor (Autoria própria).....26

Capítulo II

Figura 4: Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos de *Brucella abortus*.....44

Figura 5: (A) célula eletroquímica de três compartimentos; (B) eletrodo de trabalho de carbono grafite na base de teflon; (C) eletrodo auxiliar de platina; (D) eletrodo de referência de prata/cloreto de prata.....52

Figura 6: Potenciostato CHI Instruments 420A.....52

Figura 7: Esquema representativo da funcionalização do eletrodo (Autoria própria).....54

Figura 8: Titulação dos fagos. As colônias azuis representam a infecções das bactérias *E. coli* ER2738, com os fagos M13 que possuem o gene da β -galactosidase. A, B, C e D representam titulações de 10^{-1} até 10^{-4}59

Figura 9: Painel de pré-validação dos clones reconhecidos por IgG purificadas de animais soropositivos e soronegativos para brucelose. Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições. Os clones Ba4, Ba7 e Ba9 foram os que apresentaram melhor afinidade de ligação, quando comparado ao controle negativo e ao selvagem.62

- Figura 10:** Avaliação dos clones Ba4, Ba7 e Ba9 frente a *pool* de soro de animais soropositivos e soronegativos, em diferentes titulações de soro 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 para padronização do teste.....62
- Figura 11:** Avaliação dos clones Ba4(A), Ba7 (B), Ba9 (C) e o fago selvagem (D) frente aos soros individuais dos animais soropositivos e soronegativos utilizados no *panning*. As barras representam a reatividade com os soros e a linha pontilhada representa o *cut off*.....63
- Figura 12:** Mapeamento dos peptídeos utilizando o programa *PepSurf*. Nos alinhamentos A, B e D o clone Ba4 está apresentado de rosa, o Ba7 de azul e o clone Ba9 de vermelho, já no alinhamento apresentado em C todos os clones se alinharam em uma mesma posição na proteína, assim todos estão apresentados de cor vermelha.....64
- Figura 13:** Avaliação dos peptídeos sintéticos Ba4, Ba9, Ba4 BSA e Ba9 BSA utilizando *pool* de soro de animais soropositivos e soronegativos em diferentes diluições. Como controle negativo foi utilizado apenas o BSA, cujo valor foi subtraído dos valores apresentados.....65
- Figura 14:** Avaliação dos peptídeos sintéticos Ba4 e Ba9 acoplados a BSA frente a soros de animais soropositivos e soronegativos para brucelose. A e C representam a reatividade dos clones contra 80 soros positivos e negativos, sendo o *cut off* do clone Ba9 BSA de 0,212 e do clone Ba4BSA de 0,199. B e D representam a curva ROC dos respectivos peptídeos.....66
- Figura 15:** Detecção por voltametria de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificados com poli (3HFA) contendo: peptídeo Ba9 BSA, peptídeo/soro positivo e peptídeo/soro negativo. Tampão fosfato foi usado como eletrólito (pH 7,3), Modulação de amplitude: 0.05mV. Intervalo de pulso: 0.2s; 5m Vs-1. Os testes foram realizados em triplicatas.....67
- Figura 16:** Níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C), determinados por ELISA, em soros de camundongos BALB/c imunizados intraperitonealmente com antígeno total de *B. abortus* (G1), peptídeo sintético Ba9 BSA (G2), peptídeo sintético Ba4 BSA (G3) e respectivos controles: PBS (G4), diluente do Ba4 BSA (G5) e BSA (G6). As amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30 e 45 dias após imunização. Valores de densidade óptica (DO492nm) são indicados como média \pm erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$; ANOVA e teste de comparação múltipla de *Bonferroni*).....69

Figura 17: Produção de TNF (A), IL-6 (B), IL-17 (C), INF- γ (D), IL-2 (E), IL-4 (F) e IL-10 (G) por células de baço de camundongos BALB/c imunizados intraperitonealmente com extrato protéico de *B. abortus*, peptídeo sintético Ba9 BSA, peptídeo sintético Ba4 BSA e respectivos controles: BSA e PBS. Nos gráficos é possível observar a comparação entre os três tratamentos feitos nos grupos. As células foram coletadas duas semanas após a 3ª dose de imunização e cultivadas na presença do mitógeno Concanavalina A (ConA, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), extrato protéico de *Brucella* (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Brucella abortus* irradiada (MOI de 1:500). Sobrenadantes de cultura foram analisados após 72 horas pela dosagem de citocinas em citometro. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média dos níveis relativos ao meio.....71

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
Mg	Microgramas
µL	Microlitros
Mm	Micrometro
Aa	Aminoácido
BCIP	<i>Bromochloroindolyl phosphate</i>
BSA	Soro albumina bovina
DNA	Ácido Desorribonucléico
DO	Densidade ótica
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
G	Gramas
3-(HFA)	Ácido 3-hidroxifenilacético
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (conjugado com peroxidase)
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobulina Y (<i>Yolk</i>)
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranoside
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
M13KE	Bacteriófagos filamentosos
mA	Miliamper
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NC	Membranade nitrocelulose

Nm	Nanometro
mM	Milimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – multiplicidade de infecção
Ng	Nanograma
p/v	Peso por volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio com <i>Tween 20</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage display New England Biolabs</i>
Ph.D-C7C	Biblioteca contendo peptídeos randômicos com 7 resíduos flanqueados por 2 cisteínas
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
pIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
RELIC	<i>Receptor Ligands Contents</i>
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
Tampão MES	Tampão ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
TBS	Tampão Tris-NaCl

TBST	Tampão Trifosfato de sódio com <i>Tween 20</i>
TBSTM	TBST com 5% de leite desnatado
TMB	Tetrametilbenzidina
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume por Volume
VL	Região variável da cadeia leve de anticorpo
VH	Região variável da cadeia pesada de anticorpo
X-gal	Substrato cromogênico de β -galactosidase

Lista de Abreviaturas para Aminoácidos

Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Ácido glutâmico	E
Glutamina	Q
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

Apresentação

Esta tese contempla a seleção e caracterização de peptídeos recombinantes relacionados à *Brucella abortus* selecionados por *Phage Display*, no intuito de identificar antígenos com potencial diagnóstico e vacinal.

Sendo a brucelose bovina responsável por perdas econômicas significativas relacionadas à redução da produtividade e eficiência reprodutiva dos animais infectados, é necessário o uso de diagnósticos cada vez mais eficientes e precisos, além de vacinas que sejam protetoras aos animais e não represente riscos a quem a manipula.

A escolha da tecnologia de *Phage Display* para seleção de peptídeos imunorreativos para aplicação imunodiagnóstica e vacinal foi devido à vantagem do método em realizar seleções subtrativas que permitem a identificação de novos marcadores, por uma seleção altamente específica aos alvos. Uma vantagem crucial dessa tecnologia é a conexão direta entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, a qual possibilita uma evolução clonal de ligantes selecionados. Nesse sentido, essa metodologia tem se mostrado significativa à prática clínica, ao permitir a seleção de peptídeos e anticorpos expressos na superfície viral.

Esta tese é composta de dois capítulos sendo o primeiro deles uma fundamentação teórica a respeito da brucelose bovina e as principais técnicas utilizadas neste trabalho: tecnologia de *Phage Display* e biossensores. O segundo capítulo refere-se à identificação de mimetópos dominantes associados a resposta imune humoral em bovinos infectados com *Brucella abortus* e a verificação do potencial diagnóstico e vacinal desses peptídeos.

Capítulo I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Brucelose bovina

A brucelose bovina é uma zoonose bacteriana de caráter crônico, amplamente disseminada e de grande importância econômica. Esta doença é responsável por perdas econômicas na exploração pecuária de leite e carne, podendo ser transmitida para o homem. Em vários países do mundo têm sido alvo de programas de controle desde o início do século XX, alguns dos quais conseguiram erradicá-la.

A presença da brucelose nos rebanhos leva à queda na produção animal e torna o produto da pecuária brasileira vulnerável às barreiras sanitárias e tarifárias, diminuindo sua competitividade no comércio internacional ².

2. Epidemiologia da brucelose bovina no Brasil e seus impactos econômicos

A brucelose bovina, causada pela bactéria *Brucella abortus*, atinge tanto o gado de corte como o gado de leite e encontra-se disseminada por todo o território nacional, com variada prevalência, porém estes dados não estão bem caracterizados.

Em 1975, foi feito um levantamento no Brasil, da situação da brucelose bovina, tendo sido estimada a porcentagem de animais soropositivos em 4% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte ³.

Dados oficiais de outros levantamentos sorológicos por amostragem, realizados em alguns Estados, revelaram pequenas alterações na prevalência de brucelose: no Rio Grande do Sul, a prevalência passou de 2% em 1975, para 0,3% em 1986, após uma campanha de vacinação bem sucedida; em Santa Catarina, passou de 0,2% em 1975, para 0,6% em 1996; no Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, idêntica ao valor encontrado em 1975 para o território mato-grossense; em Minas Gerais, passou de 7,6% em 1975, para 6,7% em 1980; no Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de

9,6%, passando para 4,6% de bovinos soropositivos em 1989 ⁴. Estes valores devem ser considerados apenas como uma estimativa da enfermidade no país.

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) que tem como objetivo diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional. Assim sendo, a vacinação obrigatória contra a brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional foi introduzida pelo PNCEBT, que definiu ainda, uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas ⁴.

Minas Gerais, com sua vocação natural para o agronegócio, tem lugar de destaque na bovinocultura nacional. É o quarto Estado da Federação em extensão territorial, com 586.528km². Localiza-se na região Sudeste do Brasil, com 853 municípios ⁵. Possui um total de 349.085 propriedades, onde estão distribuídos 20.991.678 bovinos, representando 10,8% do rebanho nacional ⁶.

Em um estudo epidemiológico feito por Gonçalves e colaboradores em 2009, constatou-se que a prevalência de animais soropositivos para brucelose no Estado de Minas Gerais foi de 1,1%, sendo que as regiões de maior prevalência foram o Triângulo Mineiro com 1,7% e a região Central com 1,5%. Acredita-se que pelo fato da região do Triângulo Mineiro fazer fronteira com os Estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás, que são Estados com intensa movimentação de animais é natural supor que nesse circuito a situação epidemiológica da brucelose seja influenciada pela situação existente nesses Estados ⁶.

Os resultados obtidos em 2009 mostraram uma diminuição de prevalência da brucelose no Estado de Minas Gerais nos últimos 30 anos, o que é um indicativo de que o programa estadual de vacinação sistemática de bezerras, iniciado na década de 1990, está dando bons resultados.

No Brasil, não existem estudos concretos sobre os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina ou bubalina. As perdas diretas são decorrentes dos abortos e período de esterilidade temporária, responsáveis pelas quedas nas taxas de natalidade, aumento do intervalo entre partos, nascimentos

prematuras, esterilidade, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas^{7,8}.

As propriedades onde a doença está presente têm o valor comercial de seus animais depreciado; as regiões onde a doença é endêmica encontram-se em posição desvantajosa na disputa de novos mercados.

Estimativas mostram que a brucelose é responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e de carne e pela redução de 15% na produção de bezerros. Mostram ainda que a cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril⁴.

3. Etiologia

O gênero *Brucella* é composto atualmente por seis espécies oficiais, tendo cada uma seu hospedeiro de preferência: *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella neotomae* (ratos do deserto), *Brucella canis* (cães) e, mais recentemente uma sétima espécie, a *Brucella maris* (mamíferos marinhos), está sendo sugerida, porém ainda não foi oficializada^{9,10}. As espécies de *Brucella* se subdividem em diversos biovars ou biótipos¹⁰. As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* além dos hospedeiros já citados, podem acometer o homem¹¹.

Nas últimas décadas, os taxinomistas classificavam as espécies de *Brucella* com base principalmente nas diferenças em patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas, existindo assim todas as espécies descritas acima¹⁰. Entretanto, características genéticas e moleculares têm indicado que todos os membros do gênero *Brucella* estão intimamente relacionados, diante disso, Verger em 1985 propôs que todas as espécies de *Brucella* fossem agrupadas como sendo biovars de uma única espécie, a *Brucella melitensis*¹².

Porém, esta proposta não foi aceita pelo comitê de taxonomia, estando em uso a classificação tradicional em espécies relacionadas a patogenicidade e seus

diferentes hospedeiros, embora as brucelas não sejam espécie-específica^{9,10,13,14}.

As bactérias que compõem o gênero *Brucella*, são cocobacilos Gram-negativos, imóveis e aflagelados, não capsulados e não formam esporos, são bactérias aeróbias ou microaerófilas (não crescem em condições de anaerobiose estrita), seu metabolismo é oxidativo e a energia é produzida pela utilização de vários substratos de aminoácidos e carboidratos¹⁵. São considerados patógenos intracelulares facultativamente extracelulares, com capacidade de se multiplicar no interior de macrófagos. Apresentam formato de bacilos curtos, de 0,5-0,7µm de diâmetro e de 0,5-1,5µm de comprimento, podendo aparecer em formas isoladas, aos pares ou em pequenas cadeias^{16,17}.

As brucelas apresentam-se com morfologia colonial lisa ou clássica (S-LPS) e rugosa ou mucóide (R-LPS)¹⁸⁻²³.

A morfologia da colônia está relacionada com a composição do lipopolissacarídeo (LPS) na membrana celular. As colônias lisas possuem lipídeo A, núcleo oligossacáride e cadeia O, já as rugosas possuem apenas lipídeo A e parte do núcleo oligossacáride^{8,24}.

A distinção entre as espécies de *Brucella* e seu biovars é realizada por testes diferenciais com base na caracterização fenotípica dos antígenos LPS, tipagem de fagos, sensibilidade a corantes, requerimento de CO₂, produção de H₂S e suas propriedades metabólicas^{25,26}.

4. Características específicas da *Brucella abortus*

A espécie *Brucella abortus* está subdividida em oito biótipos distintos, sendo eles: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19. O biótipo 1 de *B. abortus* está amplamente difundido no mundo. Nas Américas é seguido pelos biótipos 4, 2, 3, 6 e 9. Na América Latina predominam o biótipo 1 (80% das estirpes), o 2, o 3 e o 4. No Brasil, até 1985, foram confirmados os biótipos 1, 2 e 3. Nos EUA predominam os biótipos 1, 2 e 4⁸.

A *Brucella abortus* é responsável pela infecção de um grande número de bovinos, bubalinos e pessoas ao redor do mundo, ocasionando perdas

econômicas importantes ao setor primário, bem como sofrimento à espécie humana, uma vez que se trata de uma das principais zoonoses existente ²⁷.

A cepa virulenta 2308 de *B. abortus* (S2308) apresenta morfologia colonial lisa, onde as bactérias possuem a parede celular constituída por uma camada externa de lipopolissacarídeo contendo a cadeia O ²⁸.

Esses epítomos da cadeia O das amostras lisas de *Brucella* sp são muito semelhantes aos encontrados em outras bactérias, como *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter fetus*, *Moraxella* sp, *Acinetobacter* sp e *Yersinia enterocolitica* do sorotipo 0:9, resultando em reações sorológicas cruzadas, o que leva a resultados falso-positivos nos testes sorológicos para a brucelose ^{25,29}.

Estas reações cruzadas se devem ao fato da maioria dos testes sorológicos particularmente aqueles que utilizam suspensão de bactérias totais como antígeno, tais como o teste de soro-aglutinação lenta (SAL) em tubo; o teste de Rosa de Bengala, Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste de Fixação do Complemento (FC); a maioria dos ELISAs, o Teste do Anel do Leite (TAL) foram desenvolvidos para detectar anticorpos imunodominantes contra a cadeia O do LPS-S ^{25,30}.

A integridade da cadeia O do LPS da parede celular de *Brucella* sp está diretamente relacionada à invasão das células do hospedeiro, pois confere maior imunogenicidade às amostras lisas quando comparadas as rugosas ³¹.

5. Patogenia

A *Brucella abortus* tem como hospedeiro preferencial os bovinos, tendo início a infecção quando a bactéria penetra nos animais pelas mucosas oral, nasal, genital, ocular, ou ainda por pequenos cortes ou abrasões da pele, sendo posteriormente encontradas no interior das células do sistema retículoendotelial como macrófagos e monócitos, sendo transportada ao linfonodo regional ³³.

Se não houver a destruição das bactérias nos gânglios, elas ganham a corrente sanguínea, penetram em macrófagos, se multiplicam e dirigem-se para órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico como baço, fígado e linfonodos supramamários ^{8,34}.

Uma das características da infecção por *Brucella* sp é o fato da bactéria conseguir resistir aos mecanismos de destruição das células fagocitárias e sobreviver dentro de macrófagos por longos períodos. Essa localização intracelular é um dos mecanismos de evasão do sistema imune, pois protege as brucelas da ação do complemento e de anticorpos específicos ⁴.

As bactérias do gênero *Brucella*, assim como outros patógenos intracelulares, necessitam de quatro fatores para garantir seu sucesso como microorganismo infeccioso, que são eles: aderência, invasão, estabelecimento e disseminação dentro do hospedeiro ³⁵.

Os órgãos preferidos para colonização das brucelas nos bovinos são aqueles que possuem maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, dentre os quais se destaca o eritritol ou eritrol, um álcool poli-hídrico de quatro carbonos presente no útero gravídico, tecidos mamários, osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutivo masculino ^{8,34}.

6. Sinais clínicos e patológicos

A brucelose pode se apresentar de diferentes formas, sendo que as características dos sinais clínicos dependerão do hospedeiro e replicação da bactéria.

Os bovinos e bubalinos são os hospedeiros preferências da *B. abortus*, e a manifestação clínica nestas espécies se caracteriza por aborto de fetos prematuros, ocorrendo normalmente em torno do sétimo mês de gestação. O aborto quase sempre acontece na primeira gestação após a infecção e em decorrência do desenvolvimento da imunidade celular, torna-se pouco frequente na segunda gestação e muito raro nas subseqüentes. Após o primeiro aborto, são mais frequentes a presença de natimortos e o nascimento de bezerras fracas ⁴.

Além de abortos, pode ocorrer retenção de placenta, secreção vaginal, que pode ser purulenta ou não, frequentemente fétida, de coloração cinza ou vermelho-pardo e manifestação clínica de infecção da glândula mamária ⁴.

A brucelose nos machos caracteriza-se pela ocorrência de uma fase inflamatória aguda, seguida de cronificação, frequentemente assintomática. Um

dos possíveis sinais é a orquite uni ou bilateral, transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume dos testículos. Em outros casos, o testículo pode apresentar um aspecto amolecido e cheio de pus. Lesões articulares também podem ser observadas ⁴.

7. Resposta imune

As brucelas são parasitas intracelulares facultativos capazes de se multiplicar e sobreviver dentro de macrófagos, devido a sua habilidade em escapar da resposta imune do hospedeiro.

A imunidade contra a *Brucella abortus* envolve a ativação antígeno-específica de células T, CD4+ e CD8+, associada à resposta humoral ³⁶.

As respostas desenvolvidas contra infecções por patógenos potenciais são conhecidas como respostas imunes, podendo ser respostas imunes adaptativas ou respostas imunes inatas. A imunidade adaptativa é mediada por linfócitos B e T que reconhecem patógenos por meio de receptores de alta afinidade, entretanto, o estabelecimento da imunidade adaptativa é lento, pois depende da ativação de genes, da síntese de proteínas e da proliferação das células envolvidas ³⁷.

A imunidade inata, por sua vez, proporciona mecanismos de defesa mais rápidos, pois está sempre pronta a combater uma grande gama de patógenos, porém não conduz a uma imunidade duradoura e não é específica para nenhum patógeno individual. O reconhecimento de patógenos invasores se dá por meio de receptores do tipo *Toll*, localizados na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). A ligação do patógeno a estes receptores induz à produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adaptativa ^{37,38}.

A resposta imune inata representa uma resposta não específica durante o estágio inicial da infecção, com a participação de células *natural killer* (NK), sistema complemento, fagócitos profissionais (macrófagos) e não profissionais (neutrófilos) ³⁵.

No caso da brucelose, a proteção contra a infecção e a eliminação da bactéria do organismo hospedeiro dependerá da resposta imune mediada por células. A imunidade celular é decorrente da interação de células fagocitárias, neutrófilos e macrófagos, com o patógeno e posterior estímulo de células específicas, linfócitos T helper (Th-CD4) e citotóxicos (CTL-CD8) ⁴.

Os linfócitos T reconhecem antígenos específicos através do TcR (composto por cadeias α/β ou γ/δ em associação com uma molécula co-receptora, CD4 ou CD8). Este co-receptor ditará a classe das moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) nas células apresentadoras de antígeno as quais processarão os fragmentos peptídeos das proteínas antigênicas que serão apresentadas às células T. Células TcR α/β , CD4 reconhecem antígenos através de MHC de classe II, enquanto células TcR α/β , CD8 reconhecem antígenos de MHC de classe I. Os antígenos de *Brucella abortus* podem ser apresentados aos linfócitos tanto por MHC de classe I como de classe II. Os linfócitos Th são subdivididos conforme a secreção específica de citocinas em resposta a estimulação antigênica. Os linfócitos Th1 são conhecidos como células T inflamatórias e os Th2 como células auxiliares na produção de anticorpos. Assim, o balanço entre os dois e o perfil das citocinas produzidas determinará se a resposta imune será predominantemente celular ou humoral ³⁹.

Apesar de existirem técnicas capazes de medir a intensidade da resposta imune celular, estas não são utilizadas na rotina de diagnóstico da infecção pela *Brucella* sp por serem complexas e de difícil execução ⁴.

A resposta imune humoral também ocorre na infecção brucélica e a detecção de anticorpos é a base das provas sorológicas de diagnóstico da enfermidade. Esses anticorpos são dirigidos contra a cadeia "O" do LPS da parede celular ⁴.

8. Diagnóstico

O diagnóstico clínico da brucelose em bovinos é difícil de ser estabelecido, devido ao tempo de incubação variável e a ausência de sinais clínicos nos animais, a não ser o aborto ⁴⁰. Por esses motivos é necessária a utilização de

diagnósticos laboratoriais, seja por métodos indiretos através da detecção de anticorpos contra a *Brucella abortus* ou por métodos diretos, feito pela identificação do agente ⁴.

Os métodos diretos incluem o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica e métodos de detecção de ácidos nucléicos, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) ⁴. O isolamento e a identificação da *B. abortus* a partir de material de aborto (feto, conteúdo estomacal de feto, placenta) ou de secreções apresentam resultados muito bons se a colheita e o transporte da amostra forem bem realizados e se a amostra for processada em laboratórios capacitados e com experiência. Entretanto, devido ao risco de contaminação humana durante o processamento da amostra, poucos são os laboratórios que realizam o exame. ^{4,8}.

A imunohistoquímica pode ser procedida em material de aborto após a fixação em formol e permite tanto a identificação do agente como a visualização de aspectos microscópicos do tecido examinado ⁴.

Técnicas mais recentes como a PCR que detecta um segmento de DNA específico da *B. abortus*, produzem melhores resultados quando realizadas a partir de bactérias isoladas em cultivo, porém exigem mão de obra experiente e equipamentos sofisticados para sua realização ⁸. O sucesso da PCR direta de material biológico (tecido placentário e fetal, sêmen, leite, sangue e outros) depende de mais dados a respeito da escolha da amostra e em quanto tempo o DNA bacteriano ainda pode ser detectado na amostra selecionada ⁴¹.

Os métodos indiretos ou sorológicos para diagnóstico da brucelose visam demonstrar a presença de anticorpos contra a *Brucella sp* nos fluídos corporais. Estes métodos são os mais utilizados quando se trabalha com rebanhos, pois são rápidos, de fácil execução e baixo custo, além de apresentarem boa sensibilidade e especificidade. São a base da busca da erradicação da brucelose, por permitir tanto o monitoramento de propriedades como de regiões inteiras ⁸.

O conhecimento da dinâmica das imunoglobulinas nos diferentes estágios da resposta imune tem orientado o desenvolvimento de inúmeros testes sorológicos. Um teste sorológico perfeito deveria detectar infecção nos estágios iniciais da doença, antes da ocorrência do aborto, e deveria discriminar anticorpos

de vacinação e de infecção; da mesma maneira, não deveria apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas ⁴.

As técnicas tradicionais para o diagnóstico sorológico incluem os testes de aglutinação, fixação de complemento e ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) que utilizam preparados com células totais, extratos sonicados ou frações de LPS, sendo tanto as proteínas de membrana externa quanto proteínas citoplasmáticas alvo de pesquisas como ferramentas de diagnóstico ^{9,40,42,43}.

A notificação obrigatória da brucelose se mostra na prática condicionada a falhas que impedem uma melhor avaliação da real condição nos rebanhos acometidos. A subnotificação da doença é um problema que necessita ser corrigido o quanto antes para que o PNCEBT tenha sucesso nos seus objetivos.

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes: Antígeno acidificado tamponado (AAT), o teste do anel em leite (TAL), 2-mercaptoetanol (2-ME) juntamente com soro aglutinação em tubos (SAT) e a fixação de complemento (FC). Os dois primeiros como testes de triagem e os últimos como confirmatórios, nos quais são utilizadas células inteiras da amostra de *Brucella abortus* (1119-3) na preparação dos antígenos ⁴.

8.1. Testes de triagem

8.1.1. Teste de soro aglutinação com antígeno acidificado tamponado (AAT)

Este teste sorológico é preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala. É o teste utilizado para triagem de rebanhos. A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a essa prova. Como podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados⁴.

Este teste trata-se de uma análise qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. Nas provas clássicas de aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG, enquanto que, nessa prova, reagem somente os isotipos da classe IgG1. O pH

acidificado da mistura soro-antígeno inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM. O AAT detecta com maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos ⁴.

8.1.2. Teste do anel em leite (TAL)

O teste do anel do leite foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. São mais comumente empregados antígenos corados com hematoxilina, que dá a cor azul característica à reação positiva. Se existirem anticorpos no leite, eles se combinarão com as *B. abortus* do antígeno, formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo que, por sua vez, será arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva) ⁴.

Caso não haja anticorpos presentes na amostragem de leite analisado, o anel de creme terá a coloração branca, e a coluna de leite permanecerá azulada o que é indicativo de uma reação negativa. Este teste é de grande valor não só para detecção de rebanhos infectados, mas também para monitorar rebanhos leiteiros livres de brucelose. Tal prova tem limitações, pois poderá apresentar resultados falso-positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mamites ou, ainda, de animais em início de lactação ⁴.

8.2. Testes confirmatórios

8.2.1. Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)

O 2-Mercaptoetanol é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro suspeito, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Este teste deve ser executado sempre em paralelo com a prova lenta em tubos.

Este teste tem como princípio a degradação dos anticorpos da classe IgM, fazendo com que sua configuração pentamérica, se reduza para unidades monoméricas, pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME.

Os resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com B19. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais ser considerados infectados ⁴.

8.2.2. Teste de soro aglutinação em tubos (SAT)

O teste de soro aglutinação em tubos é também chamado de prova lenta, pois a leitura dos resultados só é feita após 48 horas. É a prova sorológica mais antiga e ainda hoje bastante empregada, sendo utilizada em associação com o teste do 2-Mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina. É uma prova padronizada frente a um soro padrão internacional, sendo o resultado expresso em unidades internacionais.

A prova lenta permite identificar uma alta proporção de animais infectados, porém, costuma apresentar resultados falso-negativos, no caso de infecção crônica e, em algumas situações, podem aparecer títulos significativos em animais não infectados por *B. abortus* como decorrência de reações cruzadas com outras bactérias. Em animais vacinados com B19 acima de 8 meses, uma proporção importante deles pode apresentar títulos de anticorpos para essa prova por um longo tempo, ou permanentemente ⁴.

8.2.3. Fixação de Complemento (FC)

O teste de fixação de complemento é um teste diagnóstico mundialmente utilizado e aceito como teste confirmatório, ele tem sido empregado em diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicá-la. É o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais.

Na brucelose bovina, apesar de a FC detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador do complemento. Animais infectados permanecem positivos por períodos mais longos e com títulos de anticorpos fixadores de complemento mais elevados do que os detectados nas provas de aglutinação. Em animais vacinados acima de 8 meses de idade, os anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rapidamente do que os aglutinantes^{4,44}.

Caso o soro do animal apresente o anticorpo correspondente à infecção, o complemento será fixado ao complexo antígeno-anticorpo específico. Porém se o soro não contiver anticorpos específicos, o complemento permanecerá livre. O indicador é uma suspensão de 3% de células sanguíneas vermelhas de ovelha (SRBC) sensibilizadas com um volume igual de soro de coelho anti-SRBC (hemolisina), preparada numa diluição previamente determinada contendo 5 vezes a concentração mínima de hemolisina requerida para produção de 100% de lise das SRBC. Com a adição das SRBC sensibilizadas o sistema hemolítico se completará e ocorrerá hemólise. Ao contrário, se o complemento tiver sido ligado ao complexo antígeno-anticorpo não ocorrerá hemólise, pois não haverá complemento livre para se ligar com os eritrócitos sensibilizados⁴⁴.

O grau de hemólise é comparado com o padrão de 0, 25, 50, 75 e 100% de lise. Os resultados são expressos em ICFTU (Unidade Internacional do Teste de Fixação do Complemento), calculados em relação àqueles obtidos na titulação paralela com um soro padrão calibrado, o qual contém 1000 ICFTU. Em geral, reação de fixação com titulação equivalente ou maior que 20 ICFTU, será considerado positivo⁴⁴.

Apesar de ser um teste altamente sensível, alguns fatores desfavorecem sua realização, pois é um teste trabalhoso e complexo, que exige laboratórios bem equipados e uma equipe técnica treinada para realização das titulações e manutenção dos reagentes.

8.3. Outros métodos de diagnóstico

Novos métodos de diagnóstico também podem ser utilizados como ferramenta auxiliar no diagnóstico da brucelose bovina, tais como:

8.3.1. Teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto (i-ELISA)

Neste teste emprega-se como antígeno o LPS de *B. abortus* aderido em microplacas de 96 poços. Como conjugado utiliza-se anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugado com a peroxidase, e para revelar a reação, substratos cromógenos. Quanto maior a produção de cor, mais positiva é a reação. Vários i-ELISA comerciais estão disponíveis e têm sido amplamente utilizados em testes extensivos de campo. Soros de referência, positivo e negativo, foram padronizados pela OIE (OIE ELISA) e têm sido utilizados por laboratórios nacionais de referência para checar ou calibrar o teste ⁴⁴.

O i-ELISA é um teste altamente sensível, porém não é capaz de diferenciar anticorpos resultantes de vacinação com vacina B19 daqueles induzidos por cepas patogênicas ⁴.

8.3.2. Teste de ELISA competitivo (c-ELISA)

Neste teste também emprega-se como antígeno o LPS de *B. abortus* aderido em placas de 96 poços. Haverá uma competição pelo antígeno entre os anticorpos presentes no soro e o anticorpo monoclonal adicionado a esse no momento do teste. Um conjugado peroxidase-anti IgG é utilizado para detectar o anticorpo monoclonal ligado ao antígeno da placa. Quanto maior for a quantidade

de anticorpos provenientes da infecção brucélica presente no soro, menor a intensidade de cor desenvolvida após a adição do cromógeno. Os soros padronizados pela OIE ELISA devem ser utilizados por laboratórios nacionais de referência, para checar e calibrar o método ⁴⁵.

8.3.3. Teste de Polarização de Fluorescência (FPA)

O teste de polarização de fluorescência tem apresentado resultados satisfatórios relatados em literatura. É uma técnica simples e rápida que mensura a interação antígeno-anticorpo, podendo ser realizada em laboratórios ou a campo, em soro e leite ⁴⁵. A prova fundamenta-se na comparação das velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade de rotação de uma molécula, sendo inversamente proporcional a ela.

O antígeno utilizado no teste é preparado com um fragmento de baixo peso molecular (média de 22kDa) da cadeia “O” do LPS de *B. abortus* conjugado com o isotiocianato de fluoresceína ⁴⁵. Havendo anticorpos no soro, haverá a formação do complexo anticorpo-antígeno conjugado, cuja velocidade de rotação será inferior à do antígeno conjugado isolado. Determina-se a velocidade de rotação das moléculas com o auxílio de um equipamento de iluminação por luz polarizada. Com o uso de controles e de soro pré-titulado, é possível calcular a quantidade de anticorpos presente no soro testado ^{4,45}.

9. Vacinas contra brucelose bovina

Desde a identificação do agente etiológico da brucelose, vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e que não interfiram no diagnóstico da doença. A vacinação de animais tem como principal objetivo reduzir a taxa de infecção em zonas de prevalência elevada e obter rebanhos resistentes a doença, visando sua erradicação ¹¹.

Em decorrência das pesquisas, vem sendo desenvolvido um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidades, recombinantes e de DNA. Muitas dessas vacinas mostraram-se pouco protetoras, como as vacinas mortas, ou ainda estão em fases de testes, como as vacinas de subunidades, recombinantes e de DNA. As vacinas vivas atenuadas são aquelas que efetivamente foram e ainda são utilizadas nos programas de controle da brucelose. Duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), são as mais empregadas: a B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51). Ambas são boas indutoras de imunidade celular ⁴.

A vacina B19, também chamada de anabortina, é produzida com amostra de *B. abortus* lisa, que foi isolada do leite de uma vaca Jersey em 1923. Depois de acidentalmente esquecida por mais de um ano à temperatura ambiente, a amostra perdeu a virulência e desde a década de 1930 tem sido utilizada como vacina ⁴.

A B19 é uma vacina estável, as bactérias que a compõe não se multiplicam em presença do eritritol e causam mínimas reações locais e sistêmicas após sua inoculação ²⁵. Estimula o sistema imune do animal vacinado a resistir à doença, produzindo anticorpos específicos contra a cadeia O do LPS liso da parede celular da *B. abortus*. Normalmente um animal vacinado será resistente a doença por um período extenso de tempo (anos), porém os anticorpos detectáveis desaparecerão em poucos meses ⁴⁶.

A persistência desses anticorpos está relacionada com a idade de vacinação, pois a vacina B19 é atenuada para fêmeas bovinas e bubalinas vacinadas entre três e oito meses de idade podendo ser perigosa para machos de quaisquer espécies, incluindo o homem, devido à virulência residual que conserva. Caso ocorra a vacinação de machos com a B19, estes animais irão permanecer com títulos vacinais por toda a vida, além de existir a possibilidade de desenvolverem orquite. Se as fêmeas forem vacinadas com idade superior a oito meses, haverá grande probabilidade de produção de anticorpos que perdurem e interfiram no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Quando a vacinação ocorre até os oito meses de idade, tais anticorpos desaparecem

rapidamente, e os animais acima de 24 meses são totalmente negativos nas provas sorológicas^{4,8}.

Essa vacina foi empregada em vários países que erradicaram a doença como, por exemplo, Austrália, Canadá, Dinamarca, Inglaterra, Holanda, Suécia, entre outros. Foi também a vacina utilizada no programa de controle nos EUA até a primeira metade da década de 1990. No Brasil, é a vacina obrigatória para bezerras com idade entre 3 e 8 meses⁴.

O fato da vacina B19 induzir a produção de anticorpos contra a cadeia O do LPS liso da parede celular das brucelas, e isso interferir com o diagnóstico sorológico, estimulou a procura por mutantes rugosas, livres da cadeia O, estáveis, e atenuadas o suficiente para produzir colonização do hospedeiro por algumas semanas, provocando resposta imune duradoura⁸.

A vacina RB51 é uma estirpe mutante criada a partir da *B. abortus* 2308, após sucessivas passagens em meios contendo concentrações subinibitórias de rifampicina, o que resultou na perda da cadeia O do LPS, não havendo assim a indução de anticorpos normalmente detectados nos testes sorológicos convencionais. Esta estirpe apresenta características de proteção semelhantes à estirpe B19, gerando resposta imune celular e humoral, porém não induz a formação de anticorpos anti-LPS liso, não interferindo assim, no diagnóstico sorológico convencional da doença⁴⁷.

Vacas adultas, prenhes ou não, vacinadas com vacina RB51 não apresentam soroconversão frente aos testes sorológicos convencionais. A revacinação não altera a condição sorológica (negativo), mesmo quando se utilizam múltiplas doses de RB51 nesses animais²⁴.

Atualmente, a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51) é a vacina oficial do programa de controle de brucelose dos EUA, do México e do Chile. Também está aprovada em outros países onde vem sendo utilizada. No Brasil, será empregada para a vacinação estratégica de fêmeas adultas⁴.

10. Descoberta de novos alvos biológicos para diagnóstico e vacina

Dentre as tecnologias utilizadas para descoberta de novos alvos biológicos para diagnóstico e vacina existem diversas metodologias destinadas ao desenvolvimento de técnicas para avaliação de biomarcadores.

Desta forma, o emprego de ferramentas da genômica e proteômica está contribuindo para descobertas de novos antígenos vacinais, para diagnóstico ou prognóstico bem como na identificação de alvos de resistência e suscetibilidade a drogas. Para biotecnologia moderna a descoberta destes novos alvos antigênicos bem como de potenciais adjuvantes vacinais é uma das principais estratégias que vem sendo utilizada.

Dentre as metodologias utilizadas neste trabalho daremos enfoque na tecnologia de *phage display* e desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

10.1. *Phage Display*

A tecnologia de *Phage Display* ou exposição de biomoléculas em fagos é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades, como mapeamento de epítomos reconhecidos por anticorpos. A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena⁵³.

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de bacteriófagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada em 1985 por Smith, ao conseguir a expressão da enzima de restrição *EcoRI* através da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo do fago, abriu caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície destas partículas virais⁴⁸, um bacteriófago que infecta uma variedade de bactérias Gram-negativas, frequentemente a *Escherichia coli* do gênero masculino usando o *pilus* sexual como receptor⁴⁹.

As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *E. coli* via *pilus F* consistem de um DNA de fita simples incluso em uma cápsula protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 1). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2.800 cópias da proteína gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos) e 3 a 5 cópias da proteína gene 3 (g3 ou pIII, proteína de 406 aminoácidos) ⁵⁰.

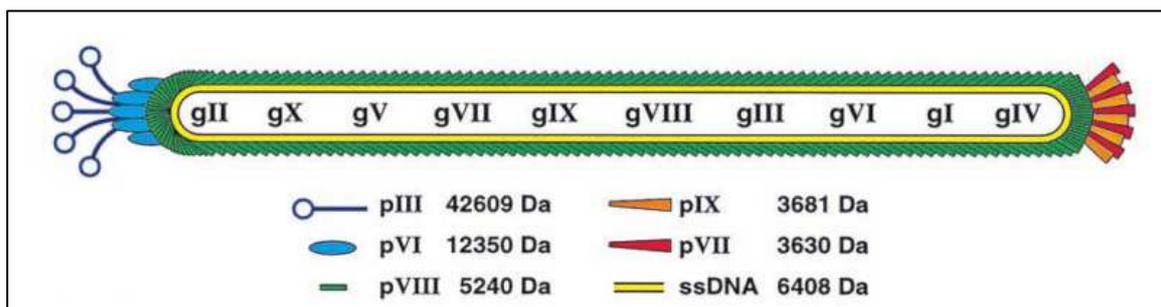


Figura 1: Esquema representativo de um bacteriófago filamentososo ¹.

Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da cápsula protéica do fago ⁵¹⁻⁵³. Assim, geralmente o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao *pilus f* da célula bacteriana e apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pVIII ⁵².

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que eles não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli*, mas preferencialmente induzem um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise.

A infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao *pilus f* de *E. coli* do gênero masculino. Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda

servir como molde para expressão das proteínas do fago pIII e pVIII. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e expulsa da bactéria através da membrana para o meio extracelular ⁵⁴.

Porém a vantagem crucial dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas ⁵⁴.

Bibliotecas de peptídeos geradas por *phage display* são extensivamente aplicadas na descoberta de uma grande variedade de polipeptídeos incluindo anticorpos, receptores, hormônios, inibidores de proteases, enzimas e proteínas ⁵⁵. Epítopos ou determinantes antigênicos (regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos), também podem ser identificados através desta metodologia de apresentação de peptídeos em fagos, a qual tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores de uma infinidade de enfermidades, incluindo câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares e auto-imunes ⁵⁶.

As bibliotecas de peptídeos randômicos compreendem um vasto número de peptídeos de um dado tamanho (10^7 - 10^9), onde suas sequências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou circular, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítopos contínuos ou descontínuos. A construção dessas bibliotecas é feita principalmente pela inserção de oligonucleotídeos degenerados aleatoriamente sintetizados quimicamente no gene que codifica a proteína do capsídeo ⁵⁴. Essas bibliotecas podem ser adquiridas comercialmente o que garante melhor a manutenção da variabilidade.

A seleção de sequências baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo é feita por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* ⁵⁷. O *biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido que pode ser placas de ELISA, microesferas magnéticas ou de afinidade, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção

biológica ou *biopanning* (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com sequências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA ⁴⁸. Para melhor entender o processo de seleção é apresentado na Figura 2 um esquema ilustrativo do processo de *biopanning*.

A tecnologia de *phage display* tem apresentado grande impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de medicamentos e outros fármacos ⁵⁸.

A seleção de peptídeos por afinidade biológica através da utilização de bibliotecas randômicas de peptídeos revela frequentemente ligantes inesperados que não se alinham em epítomos lineares e também não apresentam sequências conhecidas. Isto ocorre principalmente quando os epítomos naturais do receptor são de origem não protéica, descontínuos ou mesmo proteínas dependentes de conformação ⁵³.

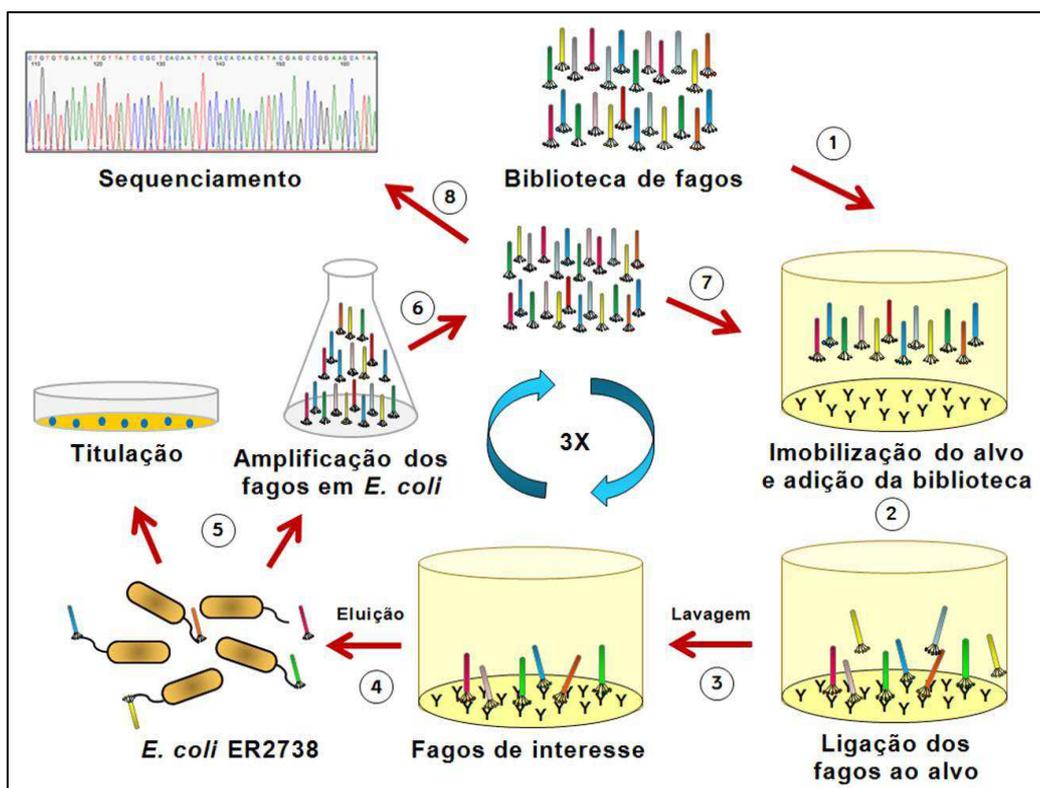


Figura 2: Esquema representativo do processo de *Biopanning*. Imobilização do alvo e adição da biblioteca de fagos, retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas, eluição dos fagos ligados e infecção em *E. coli* ER2738, titulação, amplificação dos fagos eluídos e sequenciamento da população de fagos com maior afinidade pelo alvo (Autoria própria).

O termo mimetopos refere-se a pequenos peptídeos que se ligam especificamente a um sítio de ligação do receptor e que mimetizam o epítopo natural sem apresentar similaridade com a sequência natural de aminoácidos do alvo natural. Esta definição também abrange os casos em que o ligante natural não seja proteínas. Mimetopos são usualmente de pouco valor para o mapeamento de epítomos naturais, mas apresentam importantes aplicações na pesquisa de vacinas.

Em 1994, foi demonstrado que a mimeticidade de epítomos descontínuos era possível para peptídeos mimetopos. Este aspecto foi de crucial importância, uma vez que a maioria dos anticorpos reconhece e se liga aos epítomos descontínuos (epítomos conformacionais)⁵⁹. Desta forma, mimetopos podem ser identificados sem informação prévia a respeito da especificidade dos anticorpos^{57,60}.

O aspecto referente à conformação dos peptídeos foi de crucial importância pelo desenvolvimento de bibliotecas constrictas (conformacionais). Os resíduos constantes foram incluídos nas bibliotecas randômicas, sendo frequentemente resíduos de cisteínas, provocando nos peptídeos de toda a biblioteca uma dobra. Bibliotecas constrictas apresentam uma estrutura com maior estabilidade e maior propensão para interagir com a molécula alvo⁶¹.

Quando o receptor utilizado para uma seleção por afinidade é um anticorpo, os peptídeos selecionados a partir de bibliotecas de peptídeos randômicos são chamados miméticos antigênicos dos epítomos naturais correspondentes ao determinante antigênico que provoca a seleção específica. Quando esses peptídeos são usados para imunizar animais *naive*, alguns são capazes de gerar novos anticorpos que apresentam reatividade cruzada com o epítopo natural, mesmo sem nunca haver contato prévio direto com o alvo⁶²⁻⁶⁴. Tais peptídeos são considerados miméticos imunogênicos bem como miméticos antigênicos.

A possibilidade do uso de peptídeos obtidos através do mapeamento de epítomos apresenta grande potencial para a confecção de vacinas sintéticas. Somente miméticos antigênicos e que também são miméticos imunogênicos

apresentam potencial vacinal por serem protetores e capazes de gerar anticorpos reativos a um epítopo natural no patógeno ⁶⁵.

A tecnologia de *phage display* tem sido utilizada por pesquisadores para o desenvolvimento de vacinas contra muitas doenças. Os anticorpos têm sido encontrados após a vacinação com mimetopos em vários estudos: HIV-1 ⁶⁶, hepatite viral do tipo B e C ⁶⁷, doença de Alzheimer ⁶⁸, imunoterapias de alergias ^{69,70}, entre outros.

Uma especial aplicação desta metodologia para animais de médio porte foi realizada por Manoutcharian e colaboradores, onde utilizou-se pela primeira vez fagos recombinantes como vacinas em suínos e verificou a capacidade de indução de resposta imune por fagos contendo peptídeos recombinantes da *Taenia solium*, agente causador da cisticercose em humanos ⁷¹. Estes trabalhos demonstram que o perfil antigênico completo de um organismo pode ser obtido através de seleções de bibliotecas de peptídeos expressos em fagos e revelam o potencial da utilização de fagos expressando epítopos como vacinas.

A identificação e caracterização de epítopos capazes de induzir uma resposta imunológica e protetora contra a *Brucella abortus* possibilitam a utilização de peptídeos recombinantes ou mesmo sintetizados quimicamente objetivando fins vacinais e diagnósticos.

10.2. Biossensores

Um biossensor ou sensor biológico é um dispositivo analítico que contém um material biológico sensível imobilizado e um transdutor, para produzir um sinal quantitativo, proporcional à concentração do analito em questão ⁷². Biossensores apresentam três componentes distintos:

- Um elemento bio-reconhecedor, para detectar analito(s) de interesse. Podendo ser organelas celulares, tecido animal ou vegetal, microrganismos, células, enzimas, antígenos, anticorpos, fragmentos de DNA ⁷³⁻⁷⁴,
- Um elemento transdutor para converter a interação das biomoléculas (anticorpo e antígeno) em um sinal quantificável ⁷⁵⁻⁷⁷. Os transdutores podem ser classificados como eletroquímicos (potenciométricos ⁷⁸, amperométricos ⁷⁹ e

condutimétricos ⁸⁰), térmicos ou calorimétricos ⁸¹, ópticos ⁸², piezoelétricos ⁸³ e baseados em superfície ressonante de plasma ⁸⁴.

- Um sistema de detecção para análise dos dados obtidos pelo transdutor, dispostos em gráficos ou dados numéricos.

Os sensores biológicos contribuem para o estabelecimento das técnicas analíticas, representando uma nova ferramenta para determinação de analitos no sangue (glicose, uréia, lactato, colesterol, DNA, antígenos, anticorpos), *screening* de bibliotecas de cDNA (DNA complementar), monitoramento ambiental, análise em alimentos e determinação seletiva de doenças.

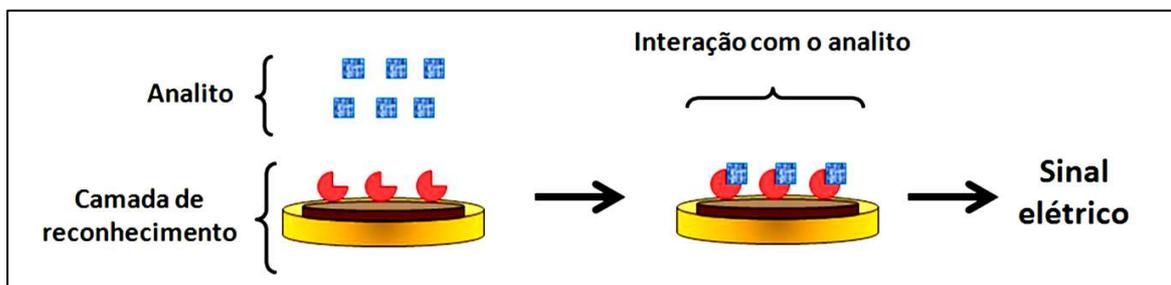


Figura 3: Esquema geral de um biossensor (Autoria própria).

11. Referências bibliográficas

1. Gao, C. et al. Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6025-30 (1999).
2. Carvalho, M.A.; Silva, C.R.L. Economia internacional. *Economia internacional* 300 (2002).
3. Anselmo, F. P. e Pavez, M.M. *Diagnóstico de Saúde Animal*. 735 (Brasília, 1977).
4. Brasil *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT*. 188 (2006).
5. IBGE Pesquisa da Produção Pecuária Municipal. 1-12 (2005).at <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2005/default.shtm>>
6. Gonçalves, V.S.P. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **61**, 35-45 (2009).
7. Campaña, R. C.; Gotardo, D. J.; Ishizuka, M.M. Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. (2002).at <http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info_doc_bru1.htm>
8. Paulin L. M., Ferreira Neto, J.S. O combate à brucelose bovina. *Situação brasileira* 154 (2003).
9. Corbel, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases* **3**, 213-221 (1997).
10. Moreno, E., Cloeckert, A. & Moriyón, I. Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology* **90**, 209-227 (2002).
11. Acha, P.N. & Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Acha PN Szyfres B 1989 *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Publicación Científica No 503 OPS 989 pp 1016* (OPS. Organización Pan-Americana de la Salud. Publicación Científica N° 503: 1986).
12. Verger, J.-M., Grimont, F., Grimont, P.A.D. & Grayon, M. Brucella, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 292-295 (1985).

13. Edwards, S. OIE standards for vaccines and future trends. *Revue scientifique et technique International Office of Epizootics* **26**, 373-378 (2007).
14. Cloeckaert, A. et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes and infection Institut Pasteur* **3**, 729-738 (2001).
15. Metcalf, H. E.; Luchsinger, D. W.; Ray, W.C. Brucellosis. *Handbook series in Zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic* 9-39 (1994).
16. Corbel, M. J.; Brinley-Morgan, W.J. Genus *Brucella*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 377-388 (1984).
17. Costa, M. Brucelose bovina e eqüina. *Doença de ruminantes e equinos* 651 (1998).
18. Poester, F, P. Vacinas contra brucelose: Passado, presente e futuro. *50th Anniversary, Meeting of Brucellosis Reseach Conference* 8-9 (1997).
19. Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D.I.; Hinchcliff, K.L. *Clínica Veterinária: Um Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 778-791 (Guanabara: Rio de Janeiro, 2002).
20. Costa, M. Brucelose bovina e eqüina. *Doenças de ruminantes e eqüinos* 187-196 (2003).
21. Fernandes, C, G. Abortos em bovinos. *Doenças de ruminantes e equinos* **2**, 349-361 (2003).
22. Jones, T. C.; Hunt, R. D.; King, N.W. *Patologia Veterinária*. 454-457 (Manole: São Paulo, 2000).
23. Corrêa, W. M.; Corrêa, C.N. Brucelose. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos* 195-218 (1992).
24. Poester, F.P. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* **24**, 5327-34 (2006).
25. Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. 189 (Paris, 1988).
26. Meyer, M.E. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. *Animal brucellosis* 1-17 (1990).
27. Young, E.J. An overview of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases* **21**, 283-289; quiz 290 (1995).

28. Bowden, R. A, Cloeckert, A, Zygmunt, M.S., Bernard, S. & Dubray, G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infection and immunity* **63**, 3945-52 (1995).
29. Corbel, M.J. Microbiology of the Genus *Brucella*. *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects* 53-72 (1989).
30. Wu, A.M., MacKenzie, N.E., Adams, G. & Pugh, R. Structural and immunochemical aspects of *Brucella abortus* endotoxins. *Advances in experimental medicine and biology* **228**, 551-576 (1988).
31. Moreno, E., Berman, D.T. & Boettcher, L.A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity* **31**, 362-370 (1981).
32. Gorvel, J.P. & Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* **90**, 281-297 (2002).
33. Enright, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *Animal brucellosis* 301-320 (1990).
34. Carter, G. R. & Chengappa, M.M. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. Lea & Febiger (Philadelphia, 1991).
35. Ko, J. & Splitter, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 65-78 (2003).
36. Golding, B. et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and infection Institut Pasteur* **3**, 43-48 (2001).
37. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. *Imunobiologia de Janeway*. 908 (Porto Alegre, 2010).
38. Werling, D. & Jungi, T.W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **91**, 1-12 (2003).
39. Wyckoff, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* **90**, 395-415 (2002).
40. McGiven, J.A. et al. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods* **278**, 171-178 (2003).
41. Bricker, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* **90**, 435-446 (2002).

42. Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* **90**, 447-459 (2002).
43. Pabuccuoglu, O. et al. Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Japanese journal of infectious diseases* **64**, 272-6 (2011).
44. Wright, P.F. International harmonization of standards for diagnostic tests and vaccines: role of the Office International des Epizooties (OIE). *Advances in Veterinary Medicine* **41**, 669-679 (1999).
45. Office International des Épizooties (OIE). *Manual of Standards for diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals* (2000).
46. Richey, E.J. & Harrell, C.D. Brucella Abortus Disease (Brucellosis) in Beef Cattle 1. *Screen* 1-5 (1997).
47. Schurig, G.G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. *Veterinary Microbiology* **28**, 171-188 (1991).
48. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
49. Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* **19**, 1-33 (2001).
50. Russel, M. Filamentous phage assembly. *Molecular Microbiology* **5**, 1607-1613 (1991).
51. Phizicky, E.M. & Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological reviews* **59**, 94-123 (1995).
52. Brígido, M.D.M. & Maranhão, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS. *Biociência* **26**, 44-51 (2002).
53. Barbas, C. F. III, Burton, D. R., Scott, J.K., Silverman, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. (New York, 2001).
54. Azzazy, H.M.E. & Highsmith, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry* **35**, 425-445 (2002).
55. de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W., Hoogenboom, H.R. A large non-immunized human Fab fragment Phage library 12 that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* **274**, 18218-18230 (1999).

56. Stephen, C.W., Helminen, P., Lane, D.P. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* **248**, 58-78 (1995).
57. Parmley, S.F. & Smith, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318 (1988).
58. Willats, W.G.T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology* **50**, 837-854 (2002).
59. Marvin, D.A., Hale, R.D., Nave, C. & Helmer-Citterich, M. Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), If1 and IKe. *Journal of Molecular Biology* **235**, 260-286 (1994).
60. Parmley, S.F. & Smith, G.P. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Advances in experimental medicine and biology* **251**, 215-218 (1989).
61. Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R. & Cesareni, G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *Journal of Molecular Biology* **222**, 301-310 (1991).
62. Pasqualini, R., Koivunen, E. & Ruoslahti, E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *The Journal of Cell Biology* **130**, 1189-1196 (1995).
63. Folgori, A. et al. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *the The European Molecular Biology Organization Journal* **13**, 2236-2243 (1994).
64. Meola, A. et al. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *The Journal of Immunology* **154**, 3162-3172 (1995).
65. Smith, G.P. & Petrenko, V.A. Phage Display. *Immunotechnology* **97**, 391-410 (1997).
66. Scala, G. et al. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *The Journal of Immunology* **162**, 6155-6161 (1999).
67. Puntoriero, G. et al. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *the The European Molecular Biology Organization Journal* **17**, 3521-3533 (1998).

68. Frenkel, D. & Solomon, B. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5675-5679 (2002).
69. Cramer, R. & Suter, M. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* **137**, 69-75 (1993).
70. McConnell, S.J., Kendall, M.L., Reilly, T.M. & Hoess, R.H. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene* **151**, 115-118 (1994).
71. Manoutcharian, K. et al. Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **99**, 11-24 (2004).
72. Healy, D.A.; Hayes, C. J.; Leonard, P.; McKenna, L.; O'Kennedy, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *TRENDS in Biotechnol* **25**, 125-131 (2007).
73. Riccardi, C. S.; Costa, P.I.; Yamanaka, H. Amperometric immunosensor. *Quim Nova* **25**, 316-320 (2002).
74. Ferreira, A. A. P.; Yamanaka, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. *Quim Nova* **29**, 137-142 (2006).
75. De La Guardia, M. Biochemical sensors: The state of the art. *Mikrochim Acta* **120**, 243-255 (1995).
76. Wang, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal* **19**, 47-53 (1999).
77. Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. preparo e aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em técnicas de extração e separação. *Polímeros biomiméticos em química analítica* 1076-1086 (2005).
78. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Saunders College Publishing (Saunders College Publishing: Orlando, Flórida, 1996).
79. Wilson, G.S. *Biosensors: Fundamentals and applications*. 165 (Oxford University Press US: 1987).
80. Trojanowicz, M.; Krawczyk, T.K. Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Mikrochim Acta* **121**, 167-181 (1995).

81. Calvoa, E. J.; Danilowicz, C. Amperimetric Enzyme Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* **8**, 563-574 (1997).
82. Marquette, C. A.; Blum, L.J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens Bioelectron* **21**, 1424-1433 (2006).
83. Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B.D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron* **17**, 345-359 (2002).
84. Sawata, S.; Kai, E.; Ikebukuro, K.; Ida, T.; Honda, T.; Karube, I. Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction. *Biosens Bioelectron* **14**, 397-404 (1999).
85. Yagupsky, P. Detection of Brucella in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3437-3442 (1999).
86. Al Dahouk, S. et al. Immunoproteomic characterization of Brucella abortus 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections. *Journal of Immunological Methods* **309**, 34-47 (2006).
87. Cassataro, J. et al. Antibody Reactivity to Omp31 from Brucella melitensis in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. *Society* **11**, 111-114 (2004).
88. Scott JK, S.G. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-390 (1990).
89. Huang J, Ru B, D.P. Bioinformatics resources and tools for phage display. *Molecules* **16**, 694-709 (2011).
90. Mineo, J. R.; Silva D. A. O.; Sopenete, M. C.; Leal, G. S.; Vidigal, L.H.G.; & Tápia, L. E. R.; Bacchin, M.I. *Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação*. 273 (EDUFU: Uberlândia, 2005).
91. Oliveira, R.M.L. et al. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. *Journal of Materials Science* **45**, 475-482 (2009).
92. Cha, S.-B. et al. Comparative study of gamma interferon production in mice immunized with outer membrane proteins and whole bacteria of Brucella abortus. *Japanese journal of infectious diseases* **63**, 49-51 (2010).
93. Ribeiro, D.P. et al. CpG-ODN combined with Neospora caninum lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. *Vaccine* **27**, 2570-2579 (2009).

94. COBEA *Manual para técnicos em bioterismo*. 259 (São Paulo, 1996).
95. Trindade, P.S. et al Anticorpos anti Brucella abortus em humanos expostos a fator de risco ocupacional. *Universidade Federal do Rio Grande – FURG* (2008).at
<<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0794-2.pdf>>
96. da Silva Ribeiro, V. et al. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. *Immunology letters* **129**, 94-9 (2010).
97. Goldbaum, F.A. et al. The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species - an antigen useful for diagnosis - is a lumazine synthase. *Biochemistry* **48**, 833-839 (1999).
98. Tabatabail, L.B. & Hennager, S.G. Cattle Serologically Positive for Brucella abortus Have Antibodies to B . abortus Cu-Zn Superoxide Dismutase. *Microbiology* **1**, 506-510 (1994).
99. Goldbaum, F.A., Leoni, J., Wallach, J.C. & Fossati, C.A. Characterization of an 18-Kilodalton Brucella Cytoplasmic Protein Which Appears To Be a Serological Marker of Active Infection of Both Human and Bovine Brucellosis. **31**, 2141-2145 (1993).
100. Baldi, P.C. et al. Humoral Immune Response against Lipopolysaccharide and Cytoplasmic Proteins of Brucella abortus in Cattle Vaccinated with B . abortus S19 or Experimentally Infected with Yersinia enterocolitica Serotype 0: 9. *Microbiology* **3**, 472-476 (1996).
101. Velikovsky, C.A. et al. Brucella Lumazine Synthase Elicits a Mixed Th1-Th2 Immune Response and Reduces Infection in Mice Challenged with Brucella abortus 544 Independently of the Adjuvant Formulation Used. *Society* **71**, 5750-5755 (2003).
102. Velikovsky, C.A. et al. A DNA Vaccine Encoding Lumazine Synthase from Brucella abortus Induces Protective Immunity in BALB / c Mice. *Society* **70**, 2507-2511 (2002).
103. Modulation of immune responses in Balbc mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine.pdf.
104. Kennedy, M.W., McIntosh, A.E., Blair, A.J. & McLaughlin, D. MHC (RT1) restriction of the antibody repertoire to infection with the nematode Nippostrongylus brasiliensis in the rat. *Immunology* **71**, 317-322 (1990).
105. Svetić, A., Jian, Y.C., Lu, P., Finkelman, F.D. & Gause, W.C. Brucella abortus induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by

- elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *International Immunology* **5**, 877-883 (1993).
106. Phillips, M., Deyoe, B.L., Canning, P.C. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen. *American Journal of Veterinary Research* **50**, 2158–2161 (1989).
 107. Carvalho Neta, A.V. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary journal (London, England: 1997)* **184**, 146-55 (2010).
 108. Barquero-Calvo, E. et al. *Brucella abortus* Uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection. *PLoS ONE* **2**, 14 (2007).
 109. Salcedo, S.P., Maechesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P., Gorvel, J.P. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. (2008).
 110. Wallis, R.S. Reactivation of latent tuberculosis by TNF blockade: the role of interferon gamma. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* **12**, 16-21 (2007).
 111. Koch, T. et al. Alterations of bacterial clearance induced by endotoxin and tumor necrosis factor. *Infection and immunity* **61**, 3143-8 (1993).
 112. Kursar, M. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* **178**, 2661-2665 (2007).

Capítulo II

MIMETOPOS IMUNODOMINANTES ASSOCIADOS A RESPOSTA HUMORAL DE BOVINOS INFECTADOS COM *Brucella abortus* E APLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E VACINAIS

Resumo

A brucelose bovina é uma doença com grande impacto na produção animal e de repercussão na saúde humana. Estimativas mostram que a brucelose é responsável pela diminuição na produção de leite e de carne e pela redução da produção de bezerras. Apesar de testes diagnósticos oficiais e sensíveis serem utilizados, ainda não se tem um teste sorológico ideal para todas as situações epidemiológicas, pois são trabalhosos, complexos e de alto custo. Em relação às vacinas, buscam-se formulações vacinais protetoras diversas e que não interfiram no diagnóstico, mas somente as vacinas vivas atenuadas são efetivamente utilizadas nos programas de controle da brucelose. Neste trabalho, peptídeos recombinantes foram selecionados pela técnica de *phage display*, após três ciclos de seleção, utilizando uma biblioteca comercial Ph.D.-C7C contra anticorpos policlonais de animais positivos para brucelose. Nove clones foram selecionados, sequenciados, traduzidos. Dois peptídeos foram sintetizados quimicamente e verificamos suas potenciais aplicações diagnósticas e vacinais. Os peptídeos foram testados por ELISA com 80 soros positivos e negativos, e apresentaram uma sensibilidade de até 97,5% na detecção de anticorpos circulantes de animais com brucelose. Visando aplicação diagnóstica, o peptídeo Ba9 foi imobilizado sobre um eletrodo de grafite modificado com poli (3-HFA) e medidas voltamétricas foram realizadas na presença de soro positivo e negativo, que mostraram ser altamente efetivo para discriminar animais doentes, resultando em uma técnica simples, rápida e reprodutível podendo futuramente ser realizada em laboratórios ou em campo. Quanto aos ensaios vacinais em camundongos imunizados com extratos protéicos e a bactéria irradiada, demonstrou-se que as formulações vacinais com os peptídeos induziram uma resposta imune celular baseada na produção de TNF α , bem como uma resposta humoral com altos níveis de IgG2a e IgG1, sugerindo um provável efeito protetor, o que deve ser comprovado com infecção ativa em ensaios biológicos posteriores.

Palavras-chave: Brucelose, diagnóstico, biossensores, vacinas, peptídeos, *phage display*.

1. Introdução

A brucelose é uma doença bacteriana de caráter crônico, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, causada por bactéria intracelular facultativa, a *Brucella abortus*. Ela tem capacidade de se ligar a linfócitos, um fator de virulência essencial para o acesso aos linfonodos e tecidos ²³. Dois fatores determinam a importância da brucelose: a perda na produção animal e a repercussão da infecção sobre a saúde humana ^{19,27}. As perdas animais diretas são decorrentes dos abortos e período de esterilidade temporária, responsáveis pelas quedas nas taxas de natalidade, aumento do intervalo entre partos, nascimentos prematuros, esterilidade, diminuição da produção de leite, morte de bezerras e interrupção de linhagens genéticas ^{7,8}.

Portanto, a justificativa para este estudo foi baseada na grande importância econômica e veterinária da doença, uma vez que quando se detecta um animal infectado, este é imediatamente isolado e sacrificado ⁴, acarretando enormes prejuízos aos produtores. Isto implica que a infecção subclínica e o diagnóstico tardio favorecem a falha no controle da cadeia de transmissão da bactéria, subestimando a verdadeira prevalência da bactéria no rebanho.

O diagnóstico clínico da brucelose em bovinos é difícil de ser estabelecido, devido ao tempo de incubação variável e a ausência de sinais clínicos nos animais, a não ser o aborto ⁴⁰. Por esses motivos é necessária a utilização de diagnósticos laboratoriais, seja por métodos indiretos através da detecção de anticorpos contra a *Brucella abortus* ou por métodos diretos, feito pela identificação do agente ⁴.

Devido às exigências para o cultivo da *Brucella*, baixa sensibilidade e longo tempo requerido para o isolamento e identificação microbiológica, o diagnóstico da brucelose é baseado principalmente em métodos sorológicos ^{42,45,85,86}.

Diversas provas sorológicas são utilizadas para identificar os animais infectados. Os principais testes sorológicos são baseados na detecção de anticorpos contra o antígeno LPS, direcionados principalmente contra o epitopo imunodominante PS-O de cepas lisas de *Brucella* ⁴⁰. Apesar do LPS provocar uma forte resposta humoral, as preparações antigênicas obtidas a partir de LPS

possuem algumas desvantagens como as reações falso-positivas ocasionadas pela reatividade cruzada com LPS de outras bactérias e reações falso-negativas devido ao efeito pró-zona ^{45,87}.

As técnicas tradicionais para o diagnóstico sorológico utilizam preparações com células totais, extratos sonicados ou frações de LPS, sendo que proteínas de membrana externa e citoplasmáticas são alvos de pesquisas como ferramentas de diagnóstico ^{9,40,42,86}. Estas preparações antigênicas são frequentemente obtidas a partir de cepas lisas de *B. abortus* ricas em LPS ⁸⁶.

Em geral todos os ensaios de detecção de anticorpos são baseados em antígenos inteiros com múltiplos epítomos, que mostram uma alta sensibilidade, porém necessitam da manipulação da *Brucella*. Epítomos únicos raramente são utilizados como marcadores por causa da dificuldade na seleção de motivos comuns que sejam amplamente reconhecidos na resposta imunológica dos animais.

As vacinas para brucelose também necessitam da manipulação da *Brucella*, pois são produzidas com as bactérias vivas atenuadas, sendo estas as que efetivamente foram e ainda são utilizadas nos programas de controle da brucelose. Vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e que não interfiram no diagnóstico da doença, o que atualmente é um grande problema. Em decorrência das pesquisas, vem sendo desenvolvido um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidades, recombinantes e de DNA. Muitas dessas vacinas mostraram-se pouco protetoras, como as vacinas mortas, ou ainda estão em fases de testes, como as vacinas de subunidades, recombinantes e de DNA.

No entanto, o desenvolvimento de novos epítomos dominantes para utilização em diagnósticos e como componentes vacinais tornou-se possível com a utilização da tecnologia de *phage display* ⁴⁸, especialmente porque os mimetopos selecionados imitam os principais determinantes antigênicos naturais que são originados da resposta imune dos próprios animais. Este tipo de seleção favorece os motivos altamente reativos, devido à sua estrutura otimizada ou propriedades funcionais ⁵³. Assim, sequências peptídicas curtas e estáveis que

possuem forte ligação aos anticorpos, receptores ou proteínas podem apresentar potenciais aplicações em diagnósticos e vacinas^{88,89}.

Portanto, neste estudo, nós selecionamos peptídeos utilizando a técnica de *phage display* contra anticorpos policlonais de animais doentes com brucelose, com o intuito de selecionar epítomos eficazes na detecção de anticorpos em bovinos contra *Brucella abortus*, excluindo a manipulação da bactéria. Propusemos também um bioeletrodo conjugado com o epítomo selecionado para detectar anticorpos no soro total por eletroquímica, que pode se tornar a base de novos biossensores. Esta técnica baseia-se na resposta específica a detecção de anticorpos-epítomo, que pode ser usado em condições de campo devido à sua flexibilidade, facilidade, resistência e baixo custo, podendo ser utilizado no mercado nacional e internacional, tornando o diagnóstico mais rápido e preciso. Por fim, caracterizamos o comportamento dos peptídeos em ensaios vacinais em camundongos, para determinar seu potencial vacinal na brucelose bovina.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção das amostras de soro

As amostras de soro utilizadas neste trabalho foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Análise e Diagnóstico Veterinário – LABVET da Agrodefesa de Goiás e pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Minas Gerais.

Para a realização da seleção dos peptídeos recombinantes foram utilizados os soros provenientes de Goiás, já as validações dos mesmos foram feitas com soros de animais de Goiás e Minas Gerais.

O grupo de animais positivos utilizados no *biopanning* foi constituído por vacas soropositivas, das raças Holandesa, Jersey e Mestiça com idade acima de 36 meses, vacinadas com a vacina B19, provenientes do Estado de Goiás, Brasil.

O grupo de animais negativos foi constituído por vacas soronegativas, da raça Mestiça com idade acima de 36 meses, contendo vacas vacinadas com a vacina B19 e não vacinadas, provenientes do Estado de Goiás, Brasil.

Todos os soros do grupo de animais positivos foram positivos para os testes clássicos de diagnósticos, como o teste rosa bengala (RBT) ou teste de soro aglutinação em tubos com agente redutor 2-mercaptoetanol (SAT/2ME), já o grupo de animais negativos ambos os testes realizados foram negativos.

2.2. Obtenção das amostras protéicas

As amostras de *Brucella abortus* cepa 2308 utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Andrey Pereira Lage da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. As bactérias foram irradiadas com os seguintes parâmetros: 14KGY, distância: 20cm, tempo: 209 minutos, taxa dose: 4.015 GY/h, no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN/UFMG.

Os peptídeos sintéticos utilizados foram obtidos por uma seleção biológica por meio da técnica de *phage display* descrita no capítulo anterior. Os ensaios que serão apresentados foram realizados utilizando apenas os peptídeos Ba4 BSA e Ba9 BSA.

2.3. Acoplamento das IgGs nas microesferas proteína G

A purificação de IgGs a partir do soro de bovinos com e sem brucelose foi realizada utilizando microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) conjugadas a proteína G (*Dynabeads - Invitrogen*) como plataforma, seguindo as recomendações do fabricante.

Cada 2×10^9 partículas das *beads* (100 μ L do estoque), foram lavadas três vezes com tampão MES (0,1M pH 5,0) para ativação das microesferas, adicionou-se em dois tubos distintos 100 μ L de *pool* de amostras soropositivas e soronegativas para brucelose, seguida de incubação por 40 minutos sob agitação a temperatura ambiente (T.A). As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então, lavadas novamente três vezes com tampão MES (0,1M pH 5,0) com a finalidade de retirar os anticorpos não ligados.

Para realizar a ligação covalente entre a microesfera e os anticorpos, o sistema *beads*-anticorpo foi lavado duas vezes com 1mL de tampão trietanolamina (0,2M pH 8,2) e, ressuspendido em 1mL de tampão de ligação covalente (20mM de dimetil pimelinidato x 2HCl em tampão trietanolamina) por 30 minutos sob agitação a T.A. A neutralização da reação da ligação covalente foi feita pela incubação do sistema *beads*-anticorpos em 1mL de tampão Tris (50mM pH 7,5) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as microesferas foram lavadas com TBS-T 0,1% de tween e bloqueadas por 1 hora a 37°C com a solução de bloqueio (5% de BSA em TBS-T 0,05% de tween) e ressuspendidas em 200 μ L de TBS.

Para certificar o acoplamento, 5 μ l das *beads* contendo IgG, dos dois grupos, foram incubados por 1 hora a 37°C com anti- IgG bovina HRP (VH + VL da Sigma) diluído na proporção 1:5000 em solução de bloqueio e com anti-IgY HRP na proporção 1:5000 para o controle da reação. Após a incubação, as *beads* foram lavadas 3 vezes com TBS-T 0,1% e reveladas com substrato de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e efetuada a leitura a 450nm em leitor de microplacas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*).

2.4. Seleção dos Peptídeos Recombinantes

2.4.1. *Biopanning* (Seleção de fagos)

Foram utilizadas 10 μ L (1×10^{11} partículas virais) de uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.-C7C da *NEW ENGLAND BioLabs® Inc.*), diluída em 190 μ L de TBS-T 0,1% para a seleção de ligantes às IgG dos animais com e sem brucelose. A biblioteca utilizada é composta por 7 aminoácidos randômicos expresso na região da pIII do bacteriófago, os quais são flanqueados por um par de resíduos de cisteína, que quando oxidados durante a montagem do fago formam uma ligação dissulfeto.

A seleção foi realizada com 20 μ L das microesferas de proteína G acopladas com IgGs dos diferentes grupos (animais soropositivos e soronegativos). Foi feita inicialmente uma seleção negativa, na qual a biblioteca de *phage display* foi incubada, por 30 minutos a T.A com as microesferas acopladas com IgGs de animais soronegativos para brucelose, em seguida, as microesferas foram precipitadas, utilizando um suporte magnético e o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo microesferas acopladas com IgGs dos animais soropositivos para brucelose, este foi incubado por 30 minutos a T.A. Posteriormente, as microesferas foram precipitadas e o sobrenadante descartado, as *beads* foram lavadas 3 vezes com TBS-T 0,1% e em seguida foi feita uma eluição negativa utilizando a vacina comercial B19 (Vallée). Em 150 μ L de tampão TBS-T 0,1% foram adicionados 50 μ L da vacina e incubados por 30 minutos a T.A. Posteriormente, precipitou as microesferas, o sobrenadante foi descartado.

As microsferas contendo o sistema *beads*-anticorpo de animais soropositivos mais os fagos ligantes, foram lavadas 10 vezes com TBS-T 0,1%, e os fagos selecionados foram recuperados por uma eluição ácida, com 500 μ L de glicina pH 2, foi feita uma incubação de 10 minutos, retirou-se o sobrenadante que foi neutralizado com 75 μ L de Tris pH 9. Esses passos foram repetidos 3 vezes (Figura 4).

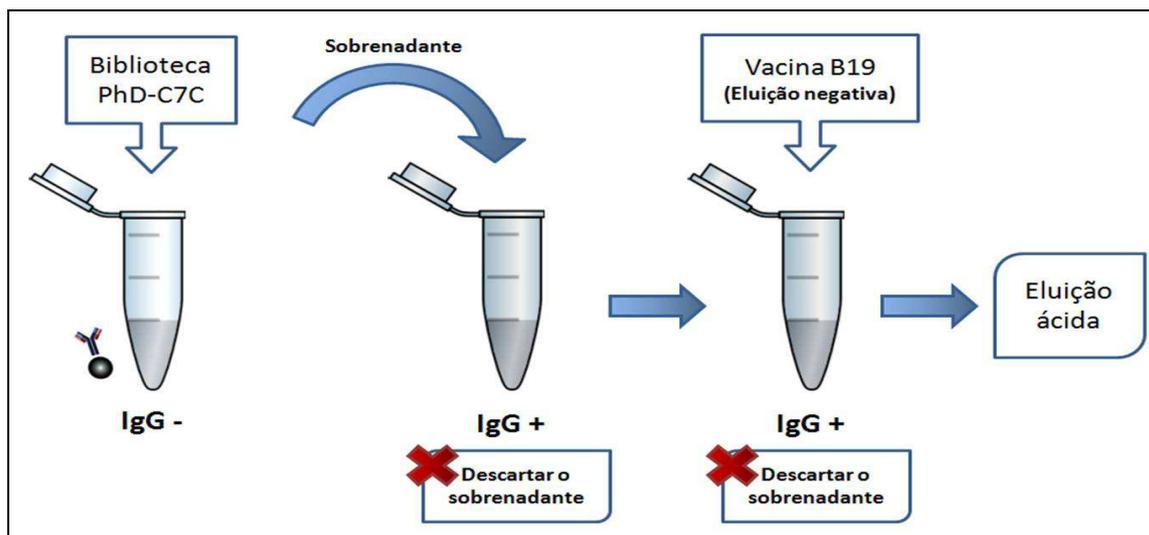


Figura 4: Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos de *Brucella abortus* (Autoria própria).

Após a seleção, a amplificação dos fagos foi feita pela inoculação em meio *Luria Bertani* (LB - Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina (20mg/mL), com uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 500µL do eluato dos fagos e incubados a 37°C por 4- 5 horas sob forte agitação.

Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 12-16 horas a 4°C para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1mL de TBS e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14.000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200µL de TBS a 0.02% de NaN_3 , obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado a 4°C. A estrigência das lavagens durante o *biopanning* variou de 0,1 a 1% em cada ciclo.

2.4.2. Titulação e purificação dos fagos

A titulação é um procedimento utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*.

Para todas as titulações foram utilizados 1,0µL dos fagos, diluídos em 9,0µL de meio de cultura LB. As diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram feitas para eluatos não amplificados e de 10^{-8} a 10^{-11} , para fagos amplificados, as diluições foram incubadas com 200µL de *E. coli* (ER2738) em fase *mid-log* ($OD_{600} \sim 0,5$) por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3,0mL de Agarose Top (10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ / litro).

Após a incubação em estufa por 18 horas à 37°C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis x fator de diluição).

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a hidrólise do substrato X-Gal e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, foram reamplificadas separadamente em placas *deepwell* para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, cada colônia isolada obtida do 3º ciclo não amplificado foi dispensada em um poço da *deepwell* contendo 1,0mL de meio de cultura com *E. coli* em fase de crescimento inicial. A placa foi incubada por 12 horas à 37°C, sob agitação. A placa *deepwell* foi centrifugada por 60 minutos a 3700rpm, para a retirada do sobrenadante da cultura. Seu conteúdo foi transferido para outra placa *deepwell* e então foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5 M) incubando-a por 12 horas à 4°C. A placa foi centrifugada por 1 hora a 3700rpm, o sobrenadante descartado, e o precipitado suspenso em 200µL de PBS.

2.4.3. Extração de DNA de Fagos

As colônias oriundas das placas tituladas no 3º ciclo do *biopanning* foram isoladas e transferidas para poços de placas de cultura (tipo *deepwell*), contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600} \sim 0,3$) para a extração do

DNA dos fagos. A placa foi vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 24 horas, sob agitação (250rpm). Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Então, 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700rpm, 20°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500µL de etanol 70% e recentrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído em 20µL de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

2.4.4. Sequenciamento

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 200ng de DNA molde, 5pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - *Biolabs*) e Premix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*). A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (*MasterCycler-Eppendorf*) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 50°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). A precipitação do DNA sequenciado foi feito com 1µL de acetato de amônio e 27,5µL etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 3700rpm e o sobrenadante descartado.

Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso

durante 5 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (*Amersham Biosciences*) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU).

A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático foi processada em *software* do próprio equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*). Logo após esta pré-análise, as sequências dos vetores foram retiradas e somente aqueles insertos com resíduos perfeitos foram traduzidos.

2.5. Análise de dados *in Silico*

Após o sequenciamento as sequências de DNA foram traduzidas pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para tradução de sequências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (Ph.D.-12™ ou Ph.D.-C7C™) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor, no caso o bacteriófago M13. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na sequência, tais como códons inesperados ou erros na sequência próxima (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

O alinhamento dos peptídeos selecionados foi testado utilizando os programas CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). O programa CLUSTAL W2 inclui ainda na análise a formulação da sequência consenso. As similaridades entre os peptídeos selecionados e as proteínas depositadas foram realizadas utilizando a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), um conjunto de programas que comparam (alinham) as sequências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucléicos e proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do *Blast* a busca foi realizada no *Protein blast* utilizando como *database* o *swissprot protein sequences* (*swissprot*), algoritmo - *blastp* (*protein-protein BLAST*) e restrita a *Brucella*.

Outros programas de bioinformática disponíveis *on line* foram utilizados para alinhamento em estrutura tridimensional, como o *Pepsurf* (<http://peptide.tau.ac.il/index.html>). As sequências das proteínas utilizadas para alinhamentos foram obtidas no RCSB PDB – *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

2.6. Screening Phage-ELISA

Para analisar a reatividade dos clones frente às IgGs dos animais soropositivos e soronegativos, foi realizado o ensaio de ELISA. As placas de microtitulação (NUNC *Maxisorp*) foram sensibilizadas com 1µg/poço de IgGs, provenientes dos dois grupos de animais, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 50mM (pH 9,6) durante 16 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM) por 1 hora a 37°C.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com 10^{11} /poço dos fagos selecionados purificados e com 10^{11} /poço do fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) para controle das reações por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T 0,05% e, em seguida, fez-se a incubação com anti-M13 conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado, durante 1 hora a 37°C.

Após 5 lavagens com PBS-T, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H₂O₂ (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

Após a realização deste ensaio foram escolhidos os fagos com maior reatividade para serem testados com soro dos animais.

2.7. Screening com soro

Após a triagem dos fagos mais reativos, os mesmos foram testados com o *pool* de soros dos animais soropositivos e soronegativos para analisar o valor preditivo positivo, negativo, sensibilidade e especificidade. Para isso, as placas de microtitulação (NUNC *Maxisorp*) foram sensibilizadas com 10^{11} /poço dos fagos selecionados purificados e com 10^{11} /poço do fago selvagem diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 50mM (pH 9,6) durante 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, descartou-se o sobrenadante, e as placas foram bloqueadas com PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C.

Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS-T 0,05% e incubação com os *pools* de soros de animais positivos e negativos para brucelose, nas proporções de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 diluídos em PBS-TM por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-T e em seguida incubada com anti-IgG bovina conjugado com peroxidase (*Sigma*) diluído 1:5000 em PBS-TM, durante 1 hora a 37°C.

Lavou-se novamente cinco vezes com PBS-T e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H₂O₂ (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

2.8. Preparação do peptídeo sintético

Depois da identificação dos clones com melhor reatividade e que melhor diferenciavam os soros positivos dos negativos, foram escolhidos dois clones para serem sintetizados quimicamente.

Os peptídeos foram produzidos pela empresa *GeneScript (Piscataway, NJ, USA)* sendo que a síntese foi feita com e sem acoplamento de BSA, totalizando 4 peptídeos sintéticos que foram denominados Ba4, Ba9, Ba4 BSA e Ba9 BSA, após purificação por cromatografia de afinidade em HPLC, os peptídeos apresentaram 95% de pureza.

Aos peptídeos sem BSA foi acrescentada uma sequência de 5 lisinas (K), amidação C-Terminal e ponte dissulfeto entre os aminoácidos 2 e 10. Os peptídeos acoplados ao BSA não possuíam a sequência de lisina, somente a amidação C-Terminal e ponte dissulfeto entre os aminoácidos 2 e 10.

Os peptídeos sintéticos foram entregues pela empresa liofilizados, a diluição foi feita segundo as recomendações do fabricante, dessa forma os peptídeos Ba4, Ba9 e Ba9 BSA foram ressuspensos em água e o Ba4 BSA foi ressuspensado em um solvente orgânico, a base de isopropanol, dimetilformamida e uréia 8M. Os peptídeos foram aliquotados para uso posterior e mantido a -20°C.

2.9. Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos

Para verificar a reatividade dos peptídeos sintéticos com os soros dos animais positivos e negativos para brucelose bovina a seguinte condição foi utilizada.

As placas de microtitulação (NUNC *Maxisorp*) foram sensibilizadas com 1µg/poço dos peptídeos sintéticos, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 50mM (pH 9,6) durante 16 horas a 4°C. Após uma lavagem com PBS as placas foram bloqueadas com PBS-BSA 5% por 1 hora a 37°C.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,1% e incubadas com *pools* de soros de animais positivos e negativos para brucelose, nas proporções de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 diluídos em PBS-T BSA 5%, por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,1% e, em seguida, fez-se a incubação com anti-IgG bovina conjugado com peroxidase (*Sigma*) diluído 1:5000 em PBS-T BSA 5%, durante 1 hora a 37°C.

Após 5 lavagens com PBS-T 0,1%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilendiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H₂O₂ (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

2.10. Análise estatística

A sensibilidade, especificidade e a eficiência do diagnóstico (ED) ou acurácia foram determinados de acordo com Mineo et al., (2005)⁹⁰. Sendo que a sensibilidade é a capacidade de um teste ser positivo (detectar os indivíduos doentes) dentre aqueles efetivamente doentes e a especificidade é a capacidade de um teste ser negativo (detectar os indivíduos sadios) dentre aqueles efetivamente livres da doença.

Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Índice de validade (\%)} = \text{Acurácia} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

Onde:

a = verdadeiros positivos no teste

b = falso positivo no teste

c = falso negativo no teste

d = verdadeiros negativos no teste

Outras análises estatísticas foram feitas utilizando-se o *software Prism 5* e as análises múltiplas foram feitas por ANOVA (*GraphPad Prism 5*).

2.11. Construção de sensor eletroquímico

Os experimentos relacionados à construção do sensor eletroquímico foram realizados no Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

A polimerização eletroquímica e as medidas voltamétricas foram realizadas em células de um e três compartimentos, acoplados a um potenciostato CHInstruments 420A. Um disco de grafite com 6 mm de diâmetro foi obtido a partir de um bastão de grafite com 99.9995 % de pureza e utilizado como eletrodo de trabalho. Platina foi utilizada como contra eletrodo ou eletrodo auxiliar e como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl (KCl 3M)). Nas Figuras 5 e 6 estão parte do material e equipamento utilizado.



Figura 5: (A) célula eletroquímica de três compartimentos; (B) eletrodo de trabalho de carbono grafite na base de teflon; (C) eletrodo auxiliar de platina; (D) eletrodo de referência de prata/cloreto de prata.



Figura 6: Potenciostato CHInstruments 420A .

2.11.1. Eletrodos de trabalho

Para a realização das voltametrias cíclicas, os eletrodos de carbono grafite foram preparados por polimento com suspensão de alumina (Buehler 0,3 μm de diâmetro). O eletrodo polido foi submetido por 10 minutos a sonicação, imerso em água deionizada, para a remoção de alumina remanescente e seco em gás nitrogênio puro.

2.11.2. Preparo dos filmes poliméricos

A análise da superfície do eletrodo bem como a funcionalização deste foi realizada de acordo com Oliveira et al., 2009 ⁹¹.

2.11.3. Imobilização da sonda sobre o eletrodo de grafite / 3-(HFA)

Para a imobilização foram gotejados 15 μL da solução do peptídeo Ba9 BSA sobre a superfície do eletrodo modificado e deixado 15 horas a 4°C. Em seguida, foram lavados em solução de tampão fosfato sob agitação e secos com gás N_2 e reservados.

2.11.4. Detecção dos alvos sobre o eletrodo de grafite/3-(HFA)

Para a detecção dos alvos complementar (soro positivo) e não complementar (soro negativo) foi realizado o procedimento de imobilização do peptídeo Ba9 BSA e em seguida os eletrodos foram incubados em solução de BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. Foram lavados em solução de tampão fosfato sob agitação e secados com gás N_2 . Posteriormente foram gotejados 15 μL do soro positivo em um eletrodo e em outro 15 μL do soro negativo, foram incubados por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram lavados em solução de tampão fosfato sob agitação e secos com gás N_2 e levados para a detecção eletroquímica.

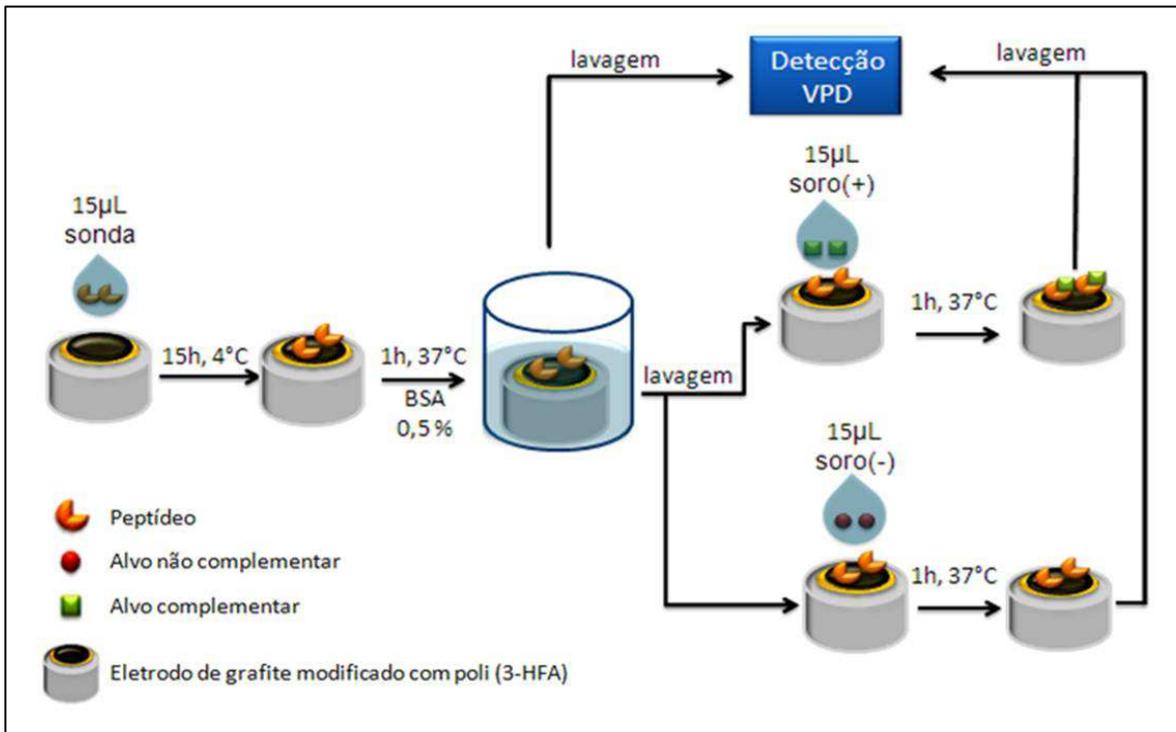


Figura 7: Esquema representativo da funcionalização do eletrodo (Autoria própria).

2.12. Preparação do antígeno solúvel de lisado total de *Brucella abortus*

O antígeno solúvel de lisado total de *Brucella abortus* 2308 foi preparado utilizando suspensões de bactérias (1×10^{11} cfu/ μ L) que foram descongeladas, tratadas com inibidores de proteases e submetidas a 6 ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, e a concentração protéica foi determinada pelo *NanoDrop Spectrophotometer ND1000*.

Alíquotas do extrato protéico foram armazenadas a -70°C, até serem utilizadas na imunização de camundongos, estimulação *in vitro* de células do baço e como antígeno em reações imunoenzimáticas (ELISA) para avaliar a resposta humoral em camundongos imunizados.

2.13. Animais e imunização

Um total de 24 camundongos isogênicos BALB/c, fêmeas, com 8 a 12 semanas de idade foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob número de protocolo 021/11.

Para os procedimentos experimentais, os animais foram distribuídos em seis grupos com 04 animais em cada grupo, conforme a seguinte formulação:

Tabela 1: Divisão dos grupos para as imunizações.

Grupo	Imunizações
1	Extrato protéico + Adjuvante*
2	Ba9 BSA + Adjuvante*
3	Ba4 BSA + Adjuvante*
4	PBS + Adjuvante*
5	Solvente do Ba4 BSA + Adjuvante*
6	BSA + Adjuvante*

* Adjuvante de *Freund* incompleto (*Sigma Chemical Co.*)

Os animais foram aleatoriamente distribuídos, identificados e imunizados por via intra peritoneal (i.p.) com três doses das formulações descritas acima, em um volume de 200 μL por animal, em intervalos de 15 dias. As concentrações dos antígenos foram determinadas com base em estudos anteriores, sendo que cada animal recebeu 20 μg de antígeno em cada imunização, juntamente com adjuvante de *Freund* incompleto⁹².

Os animais foram submetidos à sangria prévia (dia 0) e amostras de sangue foram coletadas aos 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização. Os soros obtidos após centrifugação (800 x g, 5 minutos) foram armazenados a -20°C até serem utilizados em testes sorológicos para análise da resposta humoral.

2.14. Avaliação da resposta imune humoral

2.14.1. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgG e subclasses IgG1 e IgG2a

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em amostras de soros individuais de camundongos imunizados, segundo o protocolo anteriormente descrito, com modificações⁹³.

Placas de microtitulação de poliestireno (NUNC *Maxisorp*) foram sensibilizadas (50µL/poço) com extrato protéico de *Brucella abortus* 2308 (1µg/poço), peptídeo Ba4 BSA (1µg/poço) e Ba9 BSA (1µg/poço), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C.

Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com PBS contendo 5% de BSA (PBS-T BSA) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com amostras de soros (50µL/poço) diluídas 1:50 em PBS-T BSA a 5% para IgG total e PBST-BSA a 1% para IgG1 e IgG2a, por 1 hora (IgG) ou 2 horas (IgG1 e IgG2a) a 37°C. Todos os soros foram utilizados (dia 0, 15, 30 e 45).

Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas (50µL/poço) com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (*Sigma Chemical Co.*) na diluição 1:5000 em PBS-T BSA a 5% ou com os anticorpos secundários biotinizados (*Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA*) anti-IgG1 de camundongo na diluição 1:4000 em PBS-T BSA a 1% ou anti-IgG2a de camundongo na diluição 1:2000.

Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas e incubadas (50µL/poço) com estreptavidina-peroxidase (*Sigma Chemical Co.*) diluída 1:1000 em PBS-T BSA a 1%, quando apropriado (para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a).

A reação foi revelada com a adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H₂O₂ (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

2.14.2. Avaliação da resposta imune celular: análise de citocinas

Após 45 dias de imunização (15 dias após a 3ª dose), foi realizado o sacrifício dos animais por deslocamento cervical e os baços removidos assepticamente para cultura celular e estimulação de células *in vitro*.

Os baços foram individualmente macerados em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25mM), penicilina G (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL), L-glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3mM) e 2-mercaptoetanol (50 mM).

Suspensões celulares foram lavadas (400 x g, 10 minutos, 4°C) em meio RPMI e o sedimento de células foi ressuspenso com 2mL de tampão de lise (0.16 M NH₄Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) para eritrócitos, incubando-se por 5 minutos a 37°C. Após lavagens por mais duas vezes e em meio RPMI, o sedimento final foi ressuspenso com 5mL de meio RPMI suplementado contendo 10% SFB e a suspensão celular foi mantida em banho de gelo até a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, usando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% em PBS.

As suspensões celulares foram plaqueadas, em octuplicata, em placas de cultura de 96 poços (2 x 10⁵ células/poço/200µL) e estimuladas com o mitógeno concanavalina A (ConA - *Sigma Chemical Co.*) a 2,5 mg/mL, extrato protéico de *Brucella abortus* 2308 a 20µg/mL e com a própria *Brucella abortus* 2308 irradiada onde foi utilizado um MOI (*multiplicity of infection*) de 1:500. Como controle negativo foi adicionado somente meio completo nas células. As células foram incubadas por 72 horas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. Os sobrenadantes de cultura celular foram coletados e armazenados a -70°C para posterior análise de citocinas.

A dosagem das citocinas foi realizada com a utilização do kit CBA (*Cytometric Bead Array* - *BD Biosciences*). As reações foram feitas de acordo com recomendações do fabricante e a análise foi realizada no citômetro de fluxo da BD FACSCanto II.

2.15. Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA). Diferenças entre os grupos na análise de anticorpos e dosagem de citocinas foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA ou teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de *Bonferroni* ou *Dunn*, respectivamente, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados.

O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparação entre isotipos IgG1 e IgG2a dentro de cada grupo. Todos os resultados foram considerados significativos (*p*) para um nível de $p < 0,05$.

2.16. Normas de biossegurança e manipulação de animais

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis⁹⁰. Os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal⁹⁴.

3. Resultados

3.1. Seleção de peptídeos recombinantes

3.1.1. *Biopanning* e titulações

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo (Figura 8). Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos contra as proteínas da *Brucella abortus* ficaram ligados as IgGs por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram removidos durante as lavagens. Nas ampliações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

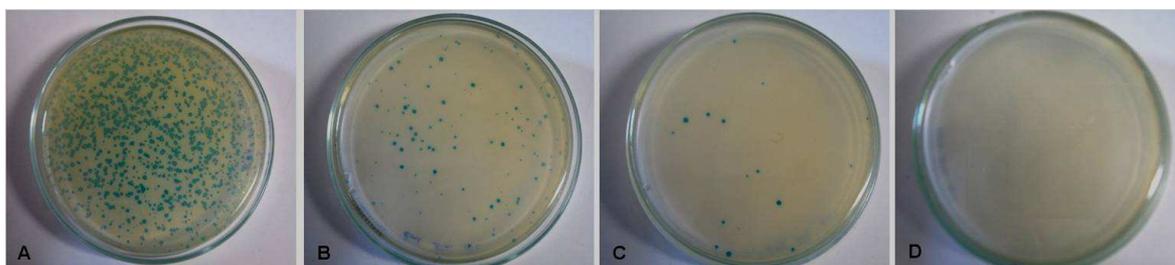


Figura 8: Titulação dos fagos. As colônias azuis representam a infecções das bactérias *E. coli* ER2738, com os fagos M13 que possuem o gene da β -galactosidase. A, B, C e D representam titulações de 10^{-1} até 10^{-4} .

3.1.2. Análise do enriquecimento

As placas utilizadas para contabilizar o título de saída foram aquelas que apresentaram maior número de colônias aparentemente isoladas, assim a quantidade de fagos selecionados foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo.

Um dos parâmetros que podem ser utilizados para indicar o sucesso da seleção dos peptídeos é a análise de enriquecimento, o qual pode ser observado na Tabela 2, onde também estão representados os títulos obtidos durante as

etapas de seleção biológica. Todas as etapas são representadas por valores de enriquecimento confirmado pela divisão do título da saída pelo título da entrada multiplicado por 100, e a determinação da taxa efetiva de enriquecimento é a divisão da taxa de enriquecimento do último ciclo dividido pela taxa do primeiro ciclo, o resultado representa o número de vezes em que a seleção enriqueceu.

Tabela 2: Taxas de enriquecimento observadas durante as seleções biológicas utilizando biblioteca Ph.D.-C7C.

Ciclos	Entrada	Saída	(S / E)* x 10²	TE**
1º Ciclo de seleção (Biblioteca original)	1x10 ¹¹	1x10 ⁴	1x10 ⁻⁷	
2º Ciclo de seleção (Fagos amplificados)	1x10 ¹¹	2x10 ⁴	2x10 ⁻⁷	20
3º Ciclo de seleção (Fagos amplificados)	1x10 ¹¹	2x10 ⁵	2x10 ⁻⁶	

* S: saída; E: entrada; ** TE: taxa de enriquecimento

Sabendo-se que quanto maior for o coeficiente de enriquecimento ao longo dos ciclos de seleção maior é o enriquecimento, o resultado obtido demonstrou que as seleções apresentaram enriquecimento nas etapas finais comparadas com as etapas iniciais de seleção, ou seja, ficaram ligados os clones com maior afinidade, o que demonstra que a seleção dos clones foi direcionada ao alvo.

3.1.3. Extração de DNA e sequenciamento dos clones de fagos

Dentre os 96 clones sequenciados, 77 apresentaram sequências válidas (sem erros de sequenciamento), sendo 9 sequências distintas. A Tabela 3 mostra a sequência e frequência dos clones obtidos.

Tabela 3: Frequência dos clones de fagos sequenciados.

Clones	Sequência	Frequência dos clones
Ba1	NDALGQL	62/77
Ba2	SPWSSLA	04/77
Ba3	NDHLLAM	02/77
Ba4	NDSYPTQ	01/77
Ba5	PNNLPPY	01/77
Ba6	NDQLFSH	01/77
Ba7	LPFTFPS	01/77
Ba8	NDARDLQ	04/77
Ba9	GFPSSSV	01/77
Total		77

3.2. *Screening Phage-ELISA*

Os fagos eluídos do terceiro ciclo do *biopanning* foram submetidos ao ensaio de *Phage-ELISA* com IgGs purificadas do mesmo *pool* de soro de animais soropositivos utilizados no *panning* para verificar a reatividade ao alvo. Utilizou-se os nove clones de fagos selecionados purificados, o fago selvagem como controle negativo de reação, além de IgG purificadas do *pool* de soro de animais soronegativos.

A Figura 9 demonstra a reatividade dos clones com os anticorpos policlonais (IgG) dos animais. Os clones Ba4, Ba7 e Ba9 obtiveram uma absorbância média superior ao controles saudáveis e ao fago selvagem e foram selecionados como os prováveis mimetopos para detectar animais positivos para brucelose, mesmo os clones não apresentando uma diferença significativa entre animais positivos e negativos para brucelose.

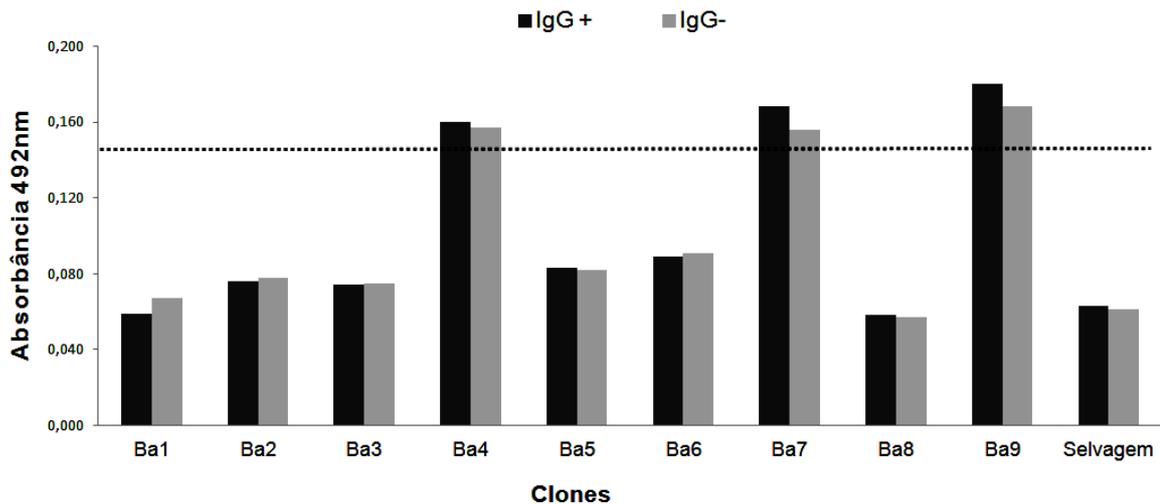


Figura 9: Painel de pré-validação dos clones reconhecidos por IgG purificadas de animais soropositivos e soronegativos para brucelose. Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições. *Cut off* = 0,145.

Após identificar que os clones Ba4, Ba7 e Ba9 apresentaram melhor afinidade de ligação (Figura 10), quando comparados ao controle selvagem, os mesmos foram submetidos ao ensaio de *Phage*-ELISA com *pool* de soro de animais soropositivos e soronegativos para verificar a reatividade ao alvo. Os soros foram utilizados nas titulações 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 para padronização do teste. Em seguida foi feito um ELISA utilizando soros individuais dos animais positivos e negativos utilizados no *panning* (Figura 11). Observou-se que o fago selvagem, que é controle negativo de reação, apresenta alta reatividade com soro total de bovinos.

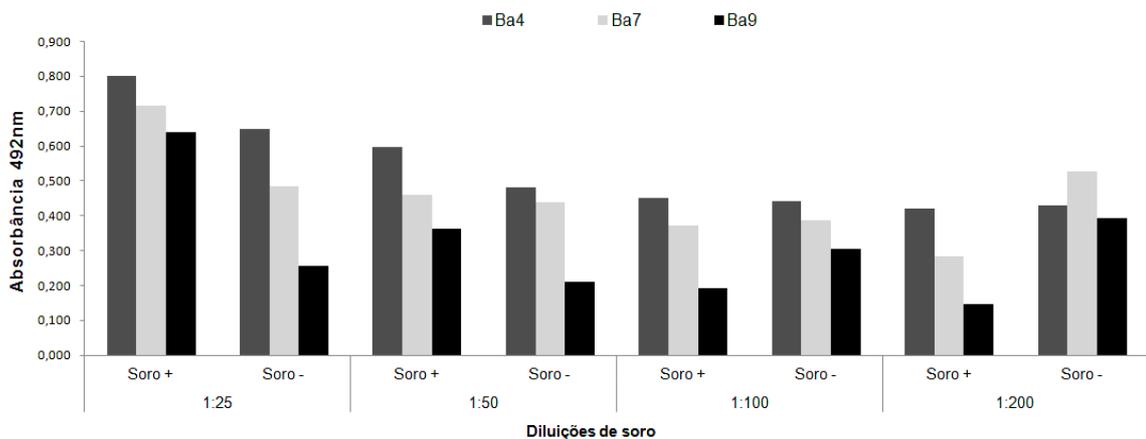


Figura 10: Avaliação dos clones Ba4, Ba7 e Ba9 frente a *pool* de soro de animais soropositivos e soronegativos, em diferentes titulações de soro 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 para padronização do teste.

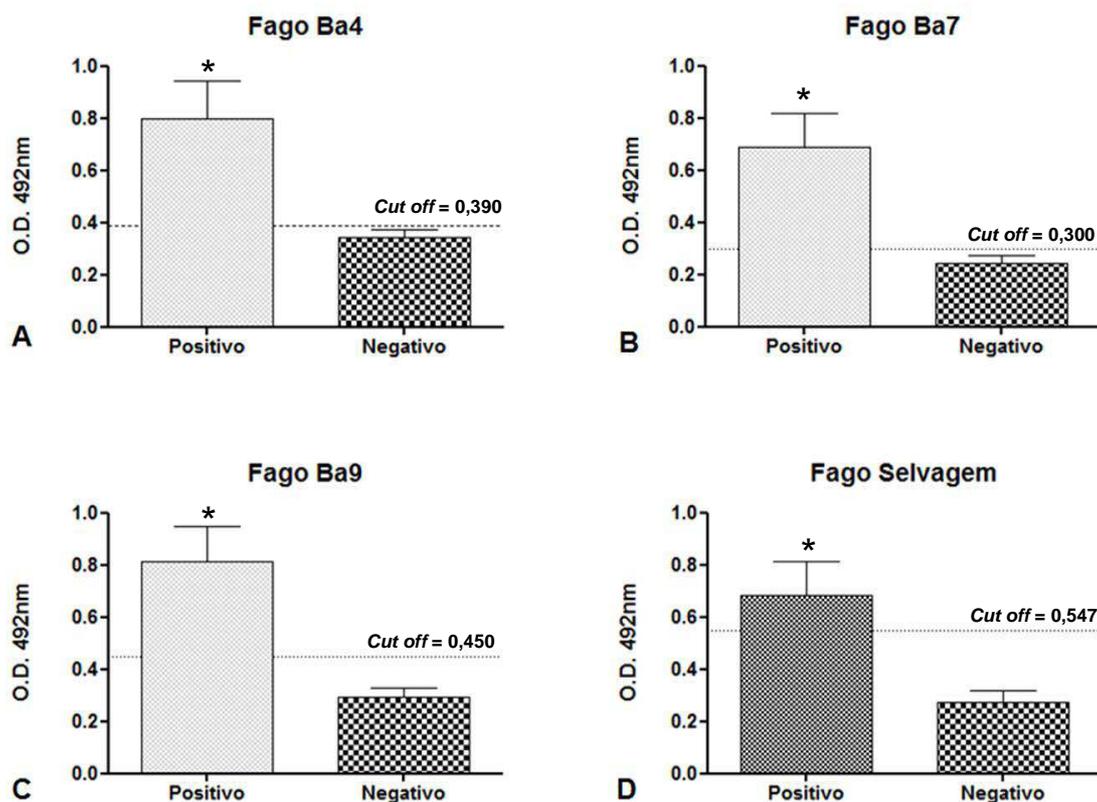


Figura 11: Avaliação dos clones Ba4(A), Ba7 (B), Ba9 (C) e o fago selvagem (D) frente aos soros individuais dos animais soropositivos e soronegativos utilizados no *panning*. As barras representam a reatividade com os soros e a linha pontilhada representa o *cut off*.

3.3. Análise de dados *in silico*

Após o sequenciamento e identificação das sequências peptídicas, foi utilizado o programa *PepSurf*, um algoritmo para o mapeamento de peptídeos selecionados por afinidade para a estrutura de um antígeno. Nestas análises foram utilizados apenas os clones Ba4, Ba7 e Ba9, que foram os que apresentaram maior reatividade nos testes imunoenzimáticos. As proteínas utilizadas para fazer os alinhamentos foram obtidas no RCSB PDB – *Protein Data Bank*, e foram escolhidas com base na literatura, uma vez que as enzimas lumazine sintase e CU/ZN superóxido dismutase de *Brucella abortus* são alvos de vários pesquisadores que buscam sua utilização em diagnóstico e como componentes vacinais para brucelose.

Na Figura 12 estão apresentados os alinhamentos realizados, à esquerda de cada alinhamento é possível observar toda a estrutura protéica juntamente com o posicionamento dos clones, e à direita são apresentadas somente as sequências peptídicas dos clones, para que se tenha uma noção de localização e disposição.

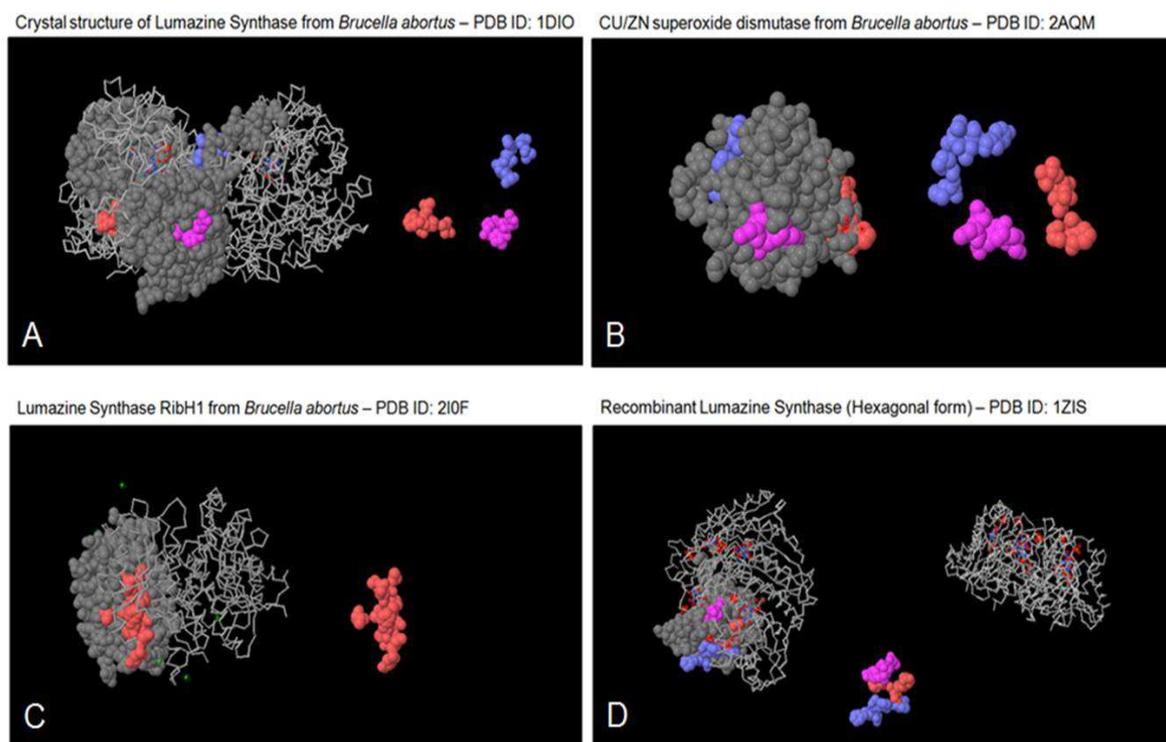


Figura 12: Mapeamento dos peptídeos utilizando o programa *PepSurf*. Nos alinhamentos A, B e D o clone Ba4 está apresentado de rosa, o Ba7 de azul e o clone Ba9 de vermelho, já no alinhamento apresentado em C todos os clones se alinharam em uma mesma posição na proteína, assim todos estão apresentados de cor vermelha.

3.4. Peptídeos sintéticos

Ensaio imunoenzimático foram realizados para avaliar a reatividade dos peptídeos sintéticos com e sem BSA com soros de animais doentes e sadios em diferentes diluições. A melhor condição observada foi na utilização dos peptídeos acoplados ao BSA por apresentar maior absorvância. Em relações as diluições dos soros optou-se por utilizar nos testes seguintes a diluição de 1:100 que foi a que apresentou melhor diferenciação entre positivo e negativo com os peptídeos acoplados ao BSA (Figura 13).

Com este teste foi possível identificar a sensibilidade da seleção e produção dos peptídeos, visto que os mesmos se ligaram positivamente ao soro de animais com brucelose (Figura 13).

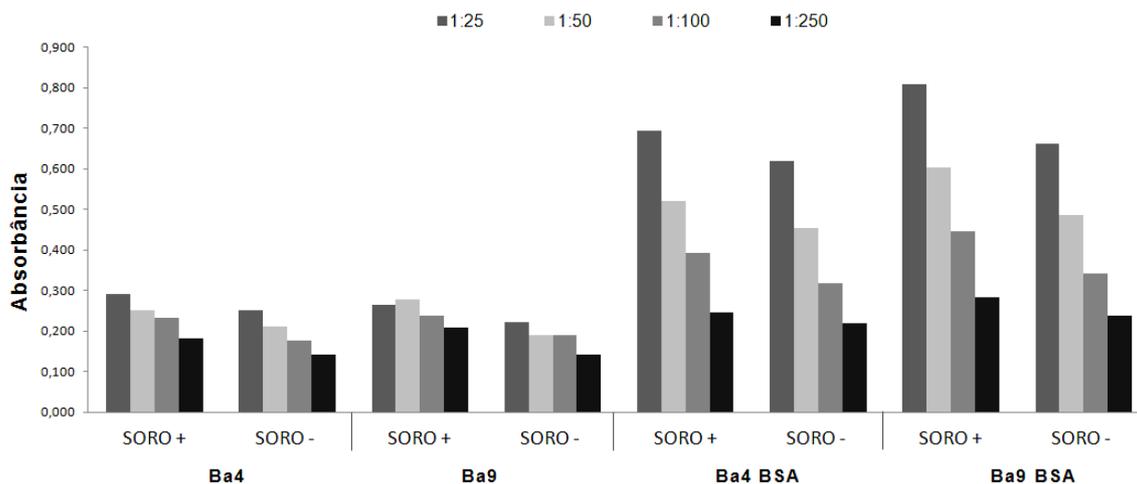


Figura 13: Avaliação dos peptídeos sintéticos Ba4, Ba9, Ba4 BSA e Ba9 BSA utilizando *pool* de soro de animais soropositivos e soronegativos em diferentes diluições. Como controle negativo foi utilizado apenas o BSA, cujo valor foi subtraído dos valores apresentados.

Após a escolha da melhor condição no teste ELISA, foram testados os níveis de IgG sérica de 80 amostras de soro positivos e 80 soro negativos para brucelose, todos os soros utilizados foram submetidos aos testes de triagem já estabelecidos para brucelose. Após análise estatística estes peptídeos demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado soros positivos e negativos para brucelose (Figura 14).

Foram feitos os cálculos da sensibilidade, especificidade e acurácia para os peptídeos com potencial diagnóstico (Tabela 3).

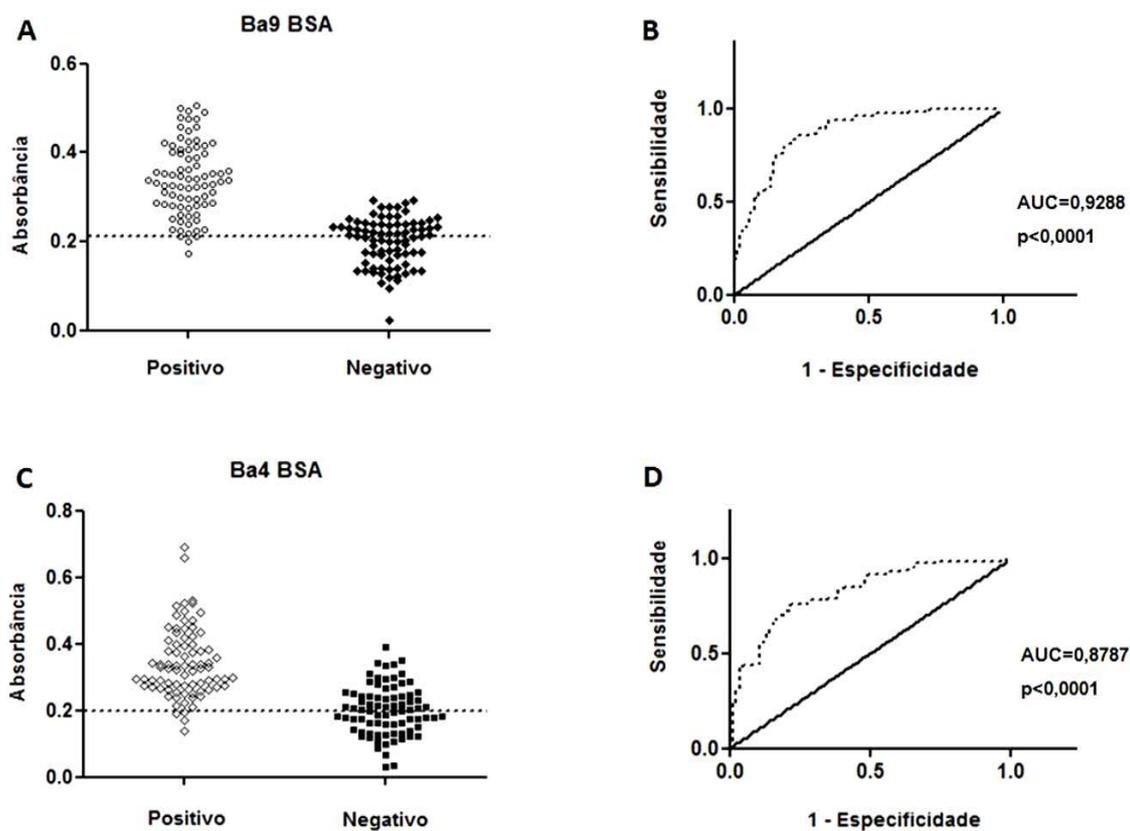


Figura 14: Avaliação dos peptídeos sintéticos Ba4 e Ba9 acoplados a BSA frente a soros de animais soropositivos e soronegativos para brucelose. A e C representam a reatividade dos clones contra 80 soros positivos e negativos, sendo o *cut off* do clone Ba9 BSA de 0,212 e do clone Ba4BSA de 0,199. B e D representam a curva ROC dos respectivos peptídeos.

Tabela 4: Sensibilidade, especificidade e acurácia obtidos nos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-*Brucella abortus* em amostras de soro, utilizando os peptídeos sintéticos.

Peptídeo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
Ba4 BSA (<i>Cut off</i> =0,199)	93,7	50	71,8
Ba9 BSA (<i>Cut off</i> =0,212)	97,5	50	72,5
Ba4 BSA + Ba9 BSA (<i>Cut off</i> =0,176)	88,6	51,1	68,7

3.5. Sensor eletroquímico

Para avaliar a imobilização do peptídeo sobre o eletrodo de grafite modificado com poli (3-HFA) e a interação da sonda com os alvos (complementar e não complementar), testes em tampão fosfato foram realizados. A Figura 15 mostra o voltamograma de pulso diferencial do peptídeo Ba9 BSA, e suas interações com os alvos.

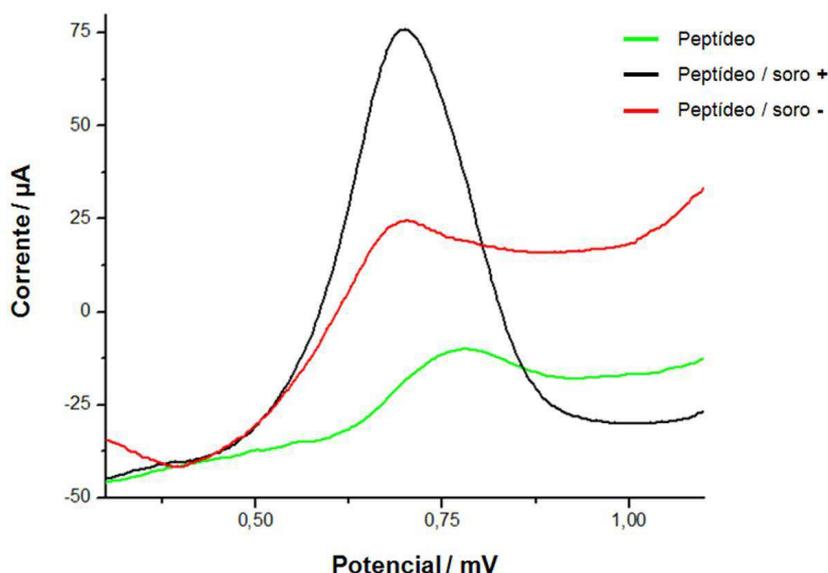


Figura 15: Detecção por voltametria de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificados com poli (3HFA) contendo: peptídeo Ba9 BSA, peptídeo/soro positivo e peptídeo/soro negativo. Tampão fosfato foi usado como eletrólito (pH 7,3), Modulação de amplitude: 0.05mV. Intervalo de pulso: 0.2s; 5m Vs⁻¹. Os testes foram realizados em triplicatas.

Em tampão acetato pH 4,5 o peptídeo (pI 8,3) possui caráter catiônico e o polímero apresenta caráter aniônico, o que favorece a imobilização. O bioeletrodo apresentou um pico de oxidação em +0,76 mV, que foi utilizado para monitorar a detecção direta do alvo.

A interação do bioeletrodo na ausência ou presença do soro negativo ou positivo apresentou valores de Δi_{pa} de 30µA, 60µA e 120µA respectivamente, o que indica que o sistema discrimina o alvo positivo do alvo negativo.

3.6. Resposta imune humoral após imunização

A cinética da resposta imune humoral de anticorpos IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a, determinados por ELISA, em soros de camundongos imunizados com o antígeno total de *Brucella abortus* 2308, peptídeo sintético Ba9 BSA, peptídeo sintético Ba4 BSA e respectivos grupos controles (PBS, diluente do Ba4 BSA e BSA) está demonstrada na figura 16.

Camundongos imunizados com os peptídeos Ba9 BSA e Ba4 BSA apresentaram maiores níveis de IgG total do 15º ao 45º dia pós-imunização (d.p.i.) em comparação com os animais imunizados com extrato protéico e controles (PBS, diluente do Ba4 e BSA) (Figura 16 A). A partir do 45º dia houve um aumento na produção de IgG no grupo imunizado com extrato protéico, não havendo mais diferença em relação aos peptídeos, somente aos controles.

Na análise da cinética do isotipo IgG1 (Figura 16 B), os grupos imunizados com os peptídeos Ba9 BSA e Ba4 BSA demonstraram maiores níveis de IgG1 do 15º ao 30º d.p.i. em comparação com o grupo extrato protéico ($p < 0,05$), com níveis semelhantes entre estes grupos somente no 45º d.p.i. Os animais imunizados dos grupos controles não apresentaram nenhuma diferença significativa nos níveis de IgG1 do ao longo do experimento.

A cinética do isotipo IgG2a (Figura 16 C) apresentou um padrão de equilíbrio entre os grupos. Camundongos imunizados com os peptídeos Ba9 BSA e Ba4 BSA mostraram um perfil de níveis crescentes de IgG2a, assim como o grupo com extrato protéico, e estes apresentaram níveis de IgG2a inferiores. Já os animais imunizados dos grupos controles não apresentaram nenhuma diferença significativa nos níveis de IgG2a do ao longo do experimento.

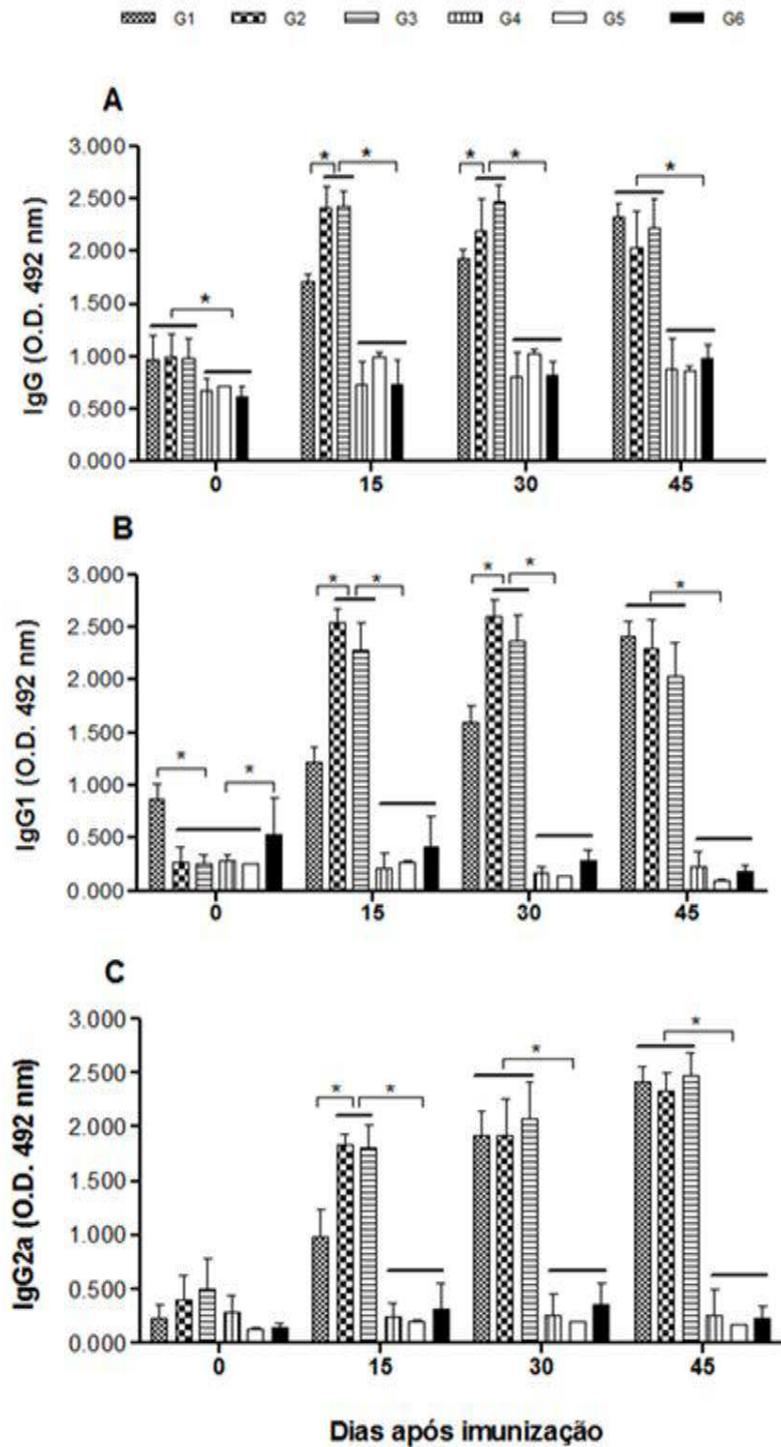


Figura 16: Níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C), determinados por ELISA, em soros de camundongos BALB/c imunizados intraperitonealmente com antígeno total de *B. abortus* (G1), peptídeo sintético Ba9 BSA (G2), peptídeo sintético Ba4 BSA (G3) e respectivos controles: PBS (G4), diluente do Ba4 BSA (G5) e BSA (G6). As amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30 e 45 dias após imunização. Valores de densidade óptica (DO492nm) são indicados como média \pm erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$; ANOVA e teste de comparação múltipla de *Bonferroni*).

3.7. Resposta imune celular: análise de citocinas

A resposta imune celular foi analisada a partir da produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-10 em sobrenadantes de cultura de células do baço após estimulação com o mitógeno ConA, extrato protéico de *Brucella* e com a *Brucella abortus* γ -irradiada (Figuras 17).

A resposta das células do baço estimuladas com o mitógeno ConA foi evidenciada pelos altos níveis de produção de IFN- γ em todos os grupos quando comparado com o meio. Após estimulação antigênica com extrato protéico células dos camundongos de todos os grupos não mostraram diferenças na produção de citocinas, além de terem sido baixas a produção.

O estímulo que gerou uma maior resposta de produção de citocinas em geral foi a *Brucella abortus* irradiada. Sendo que o grupo que mais apresentou uma produção de resposta foi o grupo de animais imunizados com extrato protéicos.

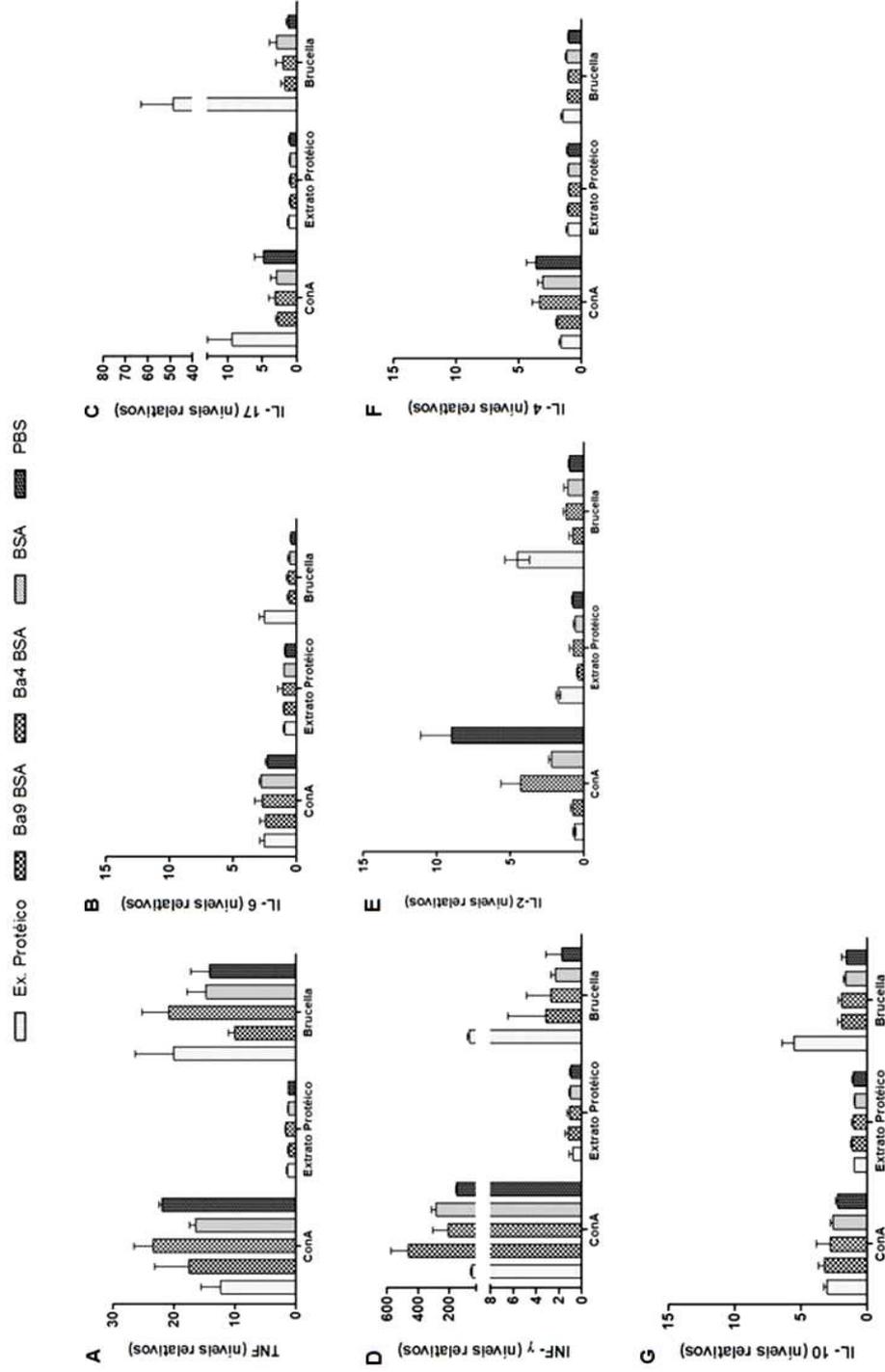


Figura 17: Produção de TNF (A), IL-6 (B), IL-17 (C), INF- γ (D), IL-2 (E), IL-4 (F) e IL-10 (G) por células de baço de camundongos BALB/c imunizados intraperitonealmente com extrato protéico de *B. abortus*, peptídeo sintético Ba9 BSA, peptídeo sintético Ba4 BSA e respectivos controles: BSA e PBS. Nos gráficos é possível observar a comparação entre os três tratamentos feitos nos grupos. As células foram coletadas duas semanas após a 3ª dose de imunização e cultivadas na presença do mitógeno Concanavalina A (ConA, 2,5 $\mu\text{g/mL}$), extrato protéico de *Brucella abortus* (20 $\mu\text{g/mL}$), *Brucella abortus* irradiada (MOI de 1:500). Sobrenadantes de cultura foram analisados após 72 horas pela dosagem de citocinas em citômetro. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média dos níveis relativos ao meio.

4. Discussão

4.1. Seleção e abordagem diagnóstica

Nesta investigação, usamos a tecnologia de *Phage Display* para selecionar epítomos imunodominantes ligantes a anticorpos circulantes de animais infectados com *Brucella abortus*. A grande vantagem da utilização destes epítomos sintéticos em testes diagnósticos ou mesmo como componentes vacinais é a eliminação da necessidade de manipular a *Brucella*, o que atualmente é um grave problema para os médicos veterinários, vacinadores e laboratoristas, pelo risco de contaminação⁹⁵.

Podemos observar que ao utilizarmos os clones selecionados ainda fusionados ao bacteriófago nos ensaios imunoenzimáticos, a reatividade dos soros positivos e negativos apresentaram um comportamento semelhante em todos os clones, sendo que em alguns clones os soros positivos foram levemente superiores aos negativos. Observamos ainda que o próprio fago selvagem por si só, consegue discriminar animais positivos de negativos para brucelose, isso se deve ao fato de ocorrer reações entre as proteínas do bacteriófago M13, utilizado na técnica de *phage display*, e anticorpos presentes no soro de bovinos, pois naturalmente há a presença de fagos no organismo desses animais, provenientes da própria *Brucella abortus* ou de outras bactérias. Sabe-se que a presença de fagos específicos tem sido demonstrada em diversas espécies de *Brucella*, o que as tornam mais patogênicas^{29,30}.

Devido à reatividade cruzada com o fago selvagem os ensaios realizados serviram apenas como *screening* de reatividade, mostrando que o *phage*-ELISA não deve ser utilizado neste caso, assim como tem sido descrito sua utilização em outras patologias como, por exemplo, em diagnóstico da neurocisticercose humana⁹⁶. Diante disso fez-se necessária a síntese química dos peptídeos para comprovar sua potencialidade como biomarcadores para brucelose. Provavelmente os outros clones, que nestes ensaios apresentaram uma menor reatividade, inclusive o clone imunodominante (Ba1), podem ser melhores que os escolhidos, porém sua síntese química e testes de reatividade serão feitos posteriormente.

Os dois clones escolhidos (Ba4 e Ba9) foram sintetizados quimicamente, sendo a sequência peptídica de cada clone produzida com e sem BSA. Foi possível observar claramente que os peptídeos acoplados ao BSA possuem um melhor desempenho na reatividade com os anticorpos dos animais, quando comparados aos peptídeos sem BSA, isso é explicado pelo fato da molécula de BSA conferir uma estabilidade a estrutura do peptídeo, o que anteriormente era proporcionado pelo bacteriófago ⁵³.

Os peptídeos sintéticos testados em ELISA apresentaram alta sensibilidade (Ba4 BSA: 82,5% e Ba9 BSA: 88,8%) e especificidade (Ba4 BSA: 81,2% e Ba9 BSA: 67,5%) na detecção de anticorpos circulantes de animais com brucelose, com uma acurácia média de 70%. Estes mesmos peptídeos, foram submetidos a alinhamentos tridimensionais em análise *in silico* com proteínas de interesse diagnóstico e vacinal para brucelose, observou-se que houve alinhamento, tanto com a lumazine sintase de *Brucella*⁹⁷ quanto com a Cu-Zn superóxido dismutase ⁹⁸, indicando que os epítomos em questão podem ser miméticos a proteínas imunogênicas de *Brucella abortus*.

Vários estudos demonstram que a lumazine sintase de *Brucella* (BLS), identificada pela primeira vez como uma proteína citoplasmática de 18kDa, presente em todas as espécies de *Brucella*, possui alto potencial para ser utilizada em diagnóstico sorológico da brucelose tanto em humanos quanto em animais ^{97,99,100}. Imunoensaios utilizando a Cu-Zn superóxido dismutase demonstram que animais soropositivos para *Brucella abortus* possuem imunoglobulinas G sérica contra esta enzima, o que foi confirmado em *western blot* com extrato protéico contendo a Cu-Zn superóxido dismutase nativa e recombinante, mostrando assim a possibilidade de sua utilização no diagnóstico da brucelose bovina ^{86,98}. As duas enzimas têm sido descritas como alvos tanto para diagnóstico quanto vacinal ¹⁰¹⁻¹⁰³.

Sabe-se que a resposta das células B contra antígenos específicos é parte do sistema imune adaptativo de mamíferos, que garante a produção de várias moléculas de imunoglobulinas contra um antígeno específico, cada uma reconhecendo um epítomo diferente. Os antígenos podem ser moléculas grandes e complexas, porém cada anticorpo único se liga apenas a um epítomo único, que

muitas vezes são específicos, e altamente dependente da herança genética ¹⁰⁴, conseqüentemente, uma resposta imune eficaz frequentemente envolve a produção de muitos anticorpos diferentes. Isto significa que uma ferramenta de diagnóstico baseado em um único epítipo só pode ser eficaz se esse determinante antigênico for altamente dominante e apresentar um amplo reconhecimento por anticorpos.

Assim, um dos objetivos desta investigação é a utilização desses peptídeos, no diagnóstico da brucelose bovina, uma vez que peptídeos sintéticos são promissores para utilização em diagnósticos de alta precisão, pois são facilmente produzidos e estão livres de contaminantes.

Após a avaliação da reatividade dos peptídeos em testes ELISA, que serviram para a calibração de parâmetros preliminares, o peptídeo Ba9 BSA foi escolhido para o passo seguinte, que foi incorporar este epítipo funcional em bioeletrodos para detecção eletroquímica de soros infectados sem que haja a necessidade de qualquer manipulação extra do soro dos animais.

Após a funcionalização do bioeletrodo com o peptídeo Ba9 BSA, demonstramos com sucesso que o sistema foi muito seletivo para os soros positivos, mesmo as amostras utilizadas sendo de soro total, que contém muitas substâncias interferentes, tais como uréia, ácido úrico, glutamato e albumina, nenhum deles gerou perturbação no processo de detecção, lembrando que mais testes deverão ser desenvolvidos posteriormente com o intuito de torná-lo efetivamente um produto comercializado.

Com isso, demonstramos que os peptídeos altamente reativos selecionado por *phage display* podem reconhecer anticorpos circulantes de animais infectados com *Brucella abortus* com alta sensibilidade, e podem ser utilizados em novos testes resultando em uma técnica simples, rápida e reprodutível.

4.2. Abordagem vacinal

Diante da perspectiva diagnóstica e sabendo que os peptídeos foram selecionados a partir de anticorpos policlonais circulantes de animais com brucelose, ou seja, a partir da resposta humoral de bovinos, apresentando alta sensibilidade, a nossa proposta foi realizar um ensaio vacinal preliminar para

verificar se estes peptídeos poderiam induzir uma resposta imune humoral e celular.

Ao analisar os resultados da dosagem dos isotipos de IgG dos camundongos imunizados com os peptídeos Ba9 BSA e Ba4 BSA, podemos observar que houve um equilíbrio entre as respostas imune Th1 e Th2, sendo que com o passar dos dias a produção de IgG1 apresenta um leve declínio, enquanto que a IgG2a apresenta uma tendência a aumentar, sugerindo que a longo prazo haja uma predominância da resposta imune Th1. Provavelmente este evento seria melhor observado com a utilização de um número maior de camundongos e por um período maior de tempo.

Sabemos que a imunização de camundongos BALB/c com *Brucella abortus* mortas gera um aumento dos níveis séricos de IgG2a e a longo prazo os clones de células T destes camundongos secretam citocinas associadas a Th1, o que vem corroborar com nossos resultados ¹⁰⁵. Apesar de efeito protetor da resposta imune humoral na brucelose ser discreto ou questionável, ele pode ser significativo no controle da infecção por *B. abortus*, uma vez que a transferência passiva de IgG2a específica diminui a carga bacteriana em camundongos ¹⁰⁶. No entanto, o papel de IgG durante a infecção ativa da *B. abortus* em bovinos permanece controverso ¹⁰⁷.

Em relação ao estímulo feito com o extrato protéico de *Brucella* os grupos não apresentaram diferença quando analisamos todas as citocinas avaliadas, o que infere que houve algum problema experimental ou que a quantidade de proteína utilizada (20µg/mL) não foi suficiente para gerar nenhum estímulo.

Em estudos recentes foi demonstrado que a *B. abortus* não induz uma resposta pró-inflamatória significativa durante a infecção em camundongos, além de possuir uma baixa atividade imunoestimuladora e baixa toxicidade para as células do hospedeiro ¹⁰⁸. Aparentemente, essa capacidade de inibir ou adiar a resposta imune do hospedeiro pode ser uma estratégia do microorganismo para causar uma infecção persistente ¹⁰⁹.

O TNF α modula uma resposta celular e a produção de NO, para matar o microorganismo, principalmente intracelular, como é o caso da *Brucella*, seu

bloqueio leva a uma reativação de microorganismos latentes no interior de macrófagos, como ocorre com o *Micobacterium* ¹¹⁰.

Analisando um contexto geral, podemos observar que embora os peptídeos não tenham levado a produção de citocinas anti-inflamatórias também não houve produção de pró-inflamatórias, exceto o TNF α , e como os níveis são altos somente para TNF α , resta saber se isso irá causar uma resposta exacerbada causando lesões de órgãos e tecidos.

Interessantemente, existem evidências de que o TNF α sozinho pode ser um fator importante no *clearance* bacteriano ¹¹¹, juntamente com baixos níveis de IL-10 ¹¹². No nosso experimento era esperado que houvesse tanto uma alta produção de IFN- γ quanto de TNF α , porém observamos altas taxas de TNF α e baixos níveis de IL-10, sugerindo que o peptídeo pode sim ter um papel protetor.

Por fim, acreditamos que o peptídeo Ba4 BSA tem um efeito protetor devido as seguintes evidências: altos níveis de IgG2a na resposta humoral, altos níveis de TNF α na resposta celular e baixos níveis de IL-10, implicando em uma provável resposta humoral e celular. Porém não se pode definir exatamente se a resposta humoral é neutralizante, pois os animais que os possuíam foram sacrificados. Não sendo possível determinar este comportamento na infecção ativa, o que implica que apenas ensaios biológicos, com desafios *in vivo* é que poderão definir a verdadeira função desses peptídeos na forma vacinal, o que requer a utilização de laboratórios e biotérios NB-3.

5. Conclusão

Nesta investigação, caracterizamos dois peptídeos imunodominantes selecionado por *phage display* frente à resposta humoral de bovinos com brucelose que potencialmente possuem função tanto diagnóstica quanto vacinal, por apresentarem uma alta sensibilidade diagnóstica (>97%). Desenvolvemos um imunossensor eletroquímico com detecção por voltametria de pulso diferencial em um eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA), funcionalizado com o peptídeo que discriminou eficientemente animais doentes de sadios, portanto, apresentamos neste trabalho um dos primeiros sensores biológicos com potencial utilização em campo para triagem de animais com brucelose, o qual apresenta características favoráveis, como simplicidade e facilidade no manuseio, alta sensibilidade e baixo custo, além de não requer mão de obra especializada.

Interessantemente, formulações vacinais com os mesmos peptídeos que reconhecem de maneira eficaz a resposta humoral, produziram uma resposta imune celular baseada na produção de TNF α , bem como uma resposta humoral com altos níveis de IgG2a e IgG1, que sugerem um provável efeito protetor, porém ensaios com desafios *in vivo* deverão ser feitos para comprovação.

6. Referências bibliográficas

1. Gao, C. et al. Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6025-30 (1999).
2. Carvalho, M.A.; Silva, C.R.L. Economia internacional. *Economia internacional* 300 (2002).
3. Anselmo, F. P. e Pavez, M.M. *Diagnóstico de Saúde Animal*. 735 (Brasília, 1977).
4. Brasil *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT*. 188 (2006).
5. IBGE Pesquisa da Produção Pecuária Municipal. 1-12 (2005).at <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2005/default.shtm>>
6. Gonçalves, V.S.P. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **61**, 35-45 (2009).
7. Campaña, R. C.; Gotardo, D. J.; Ishizuka, M.M. Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. (2002).at <http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info_doc_bru1.htm>
8. Paulin L. M., Ferreira Neto, J.S. O combate à brucelose bovina. *Situação brasileira* 154 (2003).
9. Corbel, M.J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases* **3**, 213-221 (1997).
10. Moreno, E., Cloeckert, A. & Moriyón, I. Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology* **90**, 209-227 (2002).
11. Acha, P.N. & Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Acha PN Szyfres B 1989 *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Publicación Científica No 503 OPS 989 pp 1016* (OPS. Organización Pan-Americana de la Salud. Publicación Científica N° 503: 1986).
12. Verger, J.-M., Grimont, F., Grimont, P.A.D. & Grayon, M. Brucella, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 292-295 (1985).

13. Edwards, S. OIE standards for vaccines and future trends. *Revue scientifique et technique International Office of Epizootics* **26**, 373-378 (2007).
14. Cloeckaert, A. et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes and infection Institut Pasteur* **3**, 729-738 (2001).
15. Metcalf, H. E.; Luchsinger, D. W.; Ray, W.C. Brucellosis. *Handbook series in Zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic* 9-39 (1994).
16. Corbel, M. J.; Brinley-Morgan, W.J. Genus *Brucella*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 377-388 (1984).
17. Costa, M. Brucelose bovina e eqüina. *Doença de ruminantes e equinos* 651 (1998).
18. Poester, F, P. Vacinas contra brucelose: Passado, presente e futuro. *50th Anniversary, Meeting of Brucellosis Reseach Conference* 8-9 (1997).
19. Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D.I.; Hinchcliff, K.L. *Clínica Veterinária: Um Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 778-791 (Guanabara: Rio de Janeiro, 2002).
20. Costa, M. Brucelose bovina e eqüina. *Doenças de ruminantes e eqüinos* 187-196 (2003).
21. Fernandes, C, G. Abortos em bovinos. *Doenças de ruminantes e equinos* **2**, 349-361 (2003).
22. Jones, T. C.; Hunt, R. D.; King, N.W. *Patologia Veterinária*. 454-457 (Manole: São Paulo, 2000).
23. Corrêa, W. M.; Corrêa, C.N. Brucelose. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos* 195-218 (1992).
24. Poester, F.P. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* **24**, 5327-34 (2006).
25. Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. 189 (Paris, 1988).
26. Meyer, M.E. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. *Animal brucellosis* 1-17 (1990).
27. Young, E.J. An overview of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases* **21**, 283-289; quiz 290 (1995).

28. Bowden, R. A, Cloeckert, A, Zygmunt, M.S., Bernard, S. & Dubray, G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infection and immunity* **63**, 3945-52 (1995).
29. Corbel, M.J. Microbiology of the Genus *Brucella*. *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects* 53-72 (1989).
30. Wu, A.M., MacKenzie, N.E., Adams, G. & Pugh, R. Structural and immunochemical aspects of *Brucella abortus* endotoxins. *Advances in experimental medicine and biology* **228**, 551-576 (1988).
31. Moreno, E., Berman, D.T. & Boettcher, L.A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity* **31**, 362-370 (1981).
32. Gorvel, J.P. & Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* **90**, 281-297 (2002).
33. Enright, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *Animal brucellosis* 301-320 (1990).
34. Carter, G. R. & Chengappa, M.M. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. Lea & Febiger (Philadelphia, 1991).
35. Ko, J. & Splitter, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 65-78 (2003).
36. Golding, B. et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and infection Institut Pasteur* **3**, 43-48 (2001).
37. Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. *Imunobiologia de Janeway*. 908 (Porto Alegre, 2010).
38. Werling, D. & Jungi, T.W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **91**, 1-12 (2003).
39. Wyckoff, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* **90**, 395-415 (2002).
40. McGiven, J.A. et al. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods* **278**, 171-178 (2003).
41. Bricker, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* **90**, 435-446 (2002).

42. Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* **90**, 447-459 (2002).
43. Pabuccuoglu, O. et al. Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Japanese journal of infectious diseases* **64**, 272-6 (2011).
44. Wright, P.F. International harmonization of standards for diagnostic tests and vaccines: role of the Office International des Epizooties (OIE). *Advances in Veterinary Medicine* **41**, 669-679 (1999).
45. Office International des Épizooties (OIE). *Manual of Standards for diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals* (2000).
46. Richey, E.J. & Harrell, C.D. Brucella Abortus Disease (Brucellosis) in Beef Cattle 1. *Screen* 1-5 (1997).
47. Schurig, G.G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. *Veterinary Microbiology* **28**, 171-188 (1991).
48. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
49. Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* **19**, 1-33 (2001).
50. Russel, M. Filamentous phage assembly. *Molecular Microbiology* **5**, 1607-1613 (1991).
51. Phizicky, E.M. & Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological reviews* **59**, 94-123 (1995).
52. Brígido, M.D.M. & Maranhão, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS. *Biociência* **26**, 44-51 (2002).
53. Barbas, C.F.III, Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. (New York, 2001).
54. Azzazy, H.M.E. & Highsmith, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry* **35**, 425-445 (2002).
55. de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufon, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W., Hoogenboom, H.R. A large non-immunized human Fab fragment Phage library 12 that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* **274**, 18218-18230 (1999).

56. Stephen, C.W., Helminen, P., Lane, D.P. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* **248**, 58-78 (1995).
57. Parmley, S.F. & Smith, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318 (1988).
58. Willats, W.G.T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology* **50**, 837-854 (2002).
59. Marvin, D.A., Hale, R.D., Nave, C. & Helmer-Citterich, M. Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), If1 and IKe. *Journal of Molecular Biology* **235**, 260-286 (1994).
60. Parmley, S.F. & Smith, G.P. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Advances in experimental medicine and biology* **251**, 215-218 (1989).
61. Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R. & Cesareni, G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *Journal of Molecular Biology* **222**, 301-310 (1991).
62. Pasqualini, R., Koivunen, E. & Ruoslahti, E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *The Journal of Cell Biology* **130**, 1189-1196 (1995).
63. Folgori, A. et al. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *the The European Molecular Biology Organization Journal* **13**, 2236-2243 (1994).
64. Meola, A. et al. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *The Journal of Immunology* **154**, 3162-3172 (1995).
65. Smith, G.P. & Petrenko, V.A. Phage Display. *Immunotechnology* **97**, 391-410 (1997).
66. Scala, G. et al. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *The Journal of Immunology* **162**, 6155-6161 (1999).
67. Puntoriero, G. et al. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *the The European Molecular Biology Organization Journal* **17**, 3521-3533 (1998).

68. Frenkel, D. & Solomon, B. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5675-5679 (2002).
69. Cramer, R. & Suter, M. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* **137**, 69-75 (1993).
70. McConnell, S.J., Kendall, M.L., Reilly, T.M. & Hoess, R.H. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene* **151**, 115-118 (1994).
71. Manoutcharian, K. et al. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **99**, 11-24 (2004).
72. Healy, D.A.; Hayes, C. J.; Leonard, P.; McKenna, L.; O'Kennedy, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *TRENDS in Biotechnol* **25**, 125-131 (2007).
73. Riccardi, C. S.; Costa, P.I.; Yamanaka, H. Amperometric immunosensor. *Quim Nova* **25**, 316-320 (2002).
74. Ferreira, A. A. P.; Yamanaka, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. *Quim Nova* **29**, 137-142 (2006).
75. De La Guardia, M. Biochemical sensors: The state of the art. *Mikrochim Acta* **120**, 243-255 (1995).
76. Wang, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal* **19**, 47-53 (1999).
77. Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. preparo e aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em técnicas de extração e separação. *Polímeros biomiméticos em química analítica* 1076-1086 (2005).
78. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Saunders College Publishing (Saunders College Publishing: Orlando, Flórida, 1996).
79. Wilson, G.S. *Biosensors: Fundamentals and applications*. 165 (Oxford University Press US: 1987).
80. Trojanowicz, M.; Krawczyk, T.K. Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Mikrochim Acta* **121**, 167-181 (1995).

81. Calvoa, E. J.; Danilowicz, C. Amperimetric Enzyme Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* **8**, 563-574 (1997).
82. Marquette, C. A.; Blum, L.J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens Bioelectron* **21**, 1424-1433 (2006).
83. Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B.D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron* **17**, 345-359 (2002).
84. Sawata, S.; Kai, E.; Ikebukuro, K.; Ida, T.; Honda, T.; Karube, I. Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction. *Biosens Bioelectron* **14**, 397-404 (1999).
85. Yagupsky, P. Detection of Brucella in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3437-3442 (1999).
86. Al Dahouk, S. et al. Immunoproteomic characterization of Brucella abortus 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections. *Journal of Immunological Methods* **309**, 34-47 (2006).
87. Cassataro, J. et al. Antibody Reactivity to Omp31 from Brucella melitensis in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. *Society* **11**, 111-114 (2004).
88. Scott JK, S.G. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-390 (1990).
89. Huang J, Ru B, D.P. Bioinformatics resources and tools for phage display. *Molecules* **16**, 694-709 (2011).
90. Mineo, J. R.; Silva D. A. O.; Sopenete, M. C.; Leal, G. S.; Vidigal, L.H.G.; & Tápia, L. E. R.; Bacchin, M.I. *Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação*. 273 (EDUFU: Uberlândia, 2005).
91. Oliveira, R.M.L. et al. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. *Journal of Materials Science* **45**, 475-482 (2009).
92. Cha, S.-B. et al. Comparative study of gamma interferon production in mice immunized with outer membrane proteins and whole bacteria of Brucella abortus. *Japanese journal of infectious diseases* **63**, 49-51 (2010).
93. Ribeiro, D.P. et al. CpG-ODN combined with Neospora caninum lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. *Vaccine* **27**, 2570-2579 (2009).

94. COBEA *Manual para técnicos em bioterismo*. 259 (São Paulo, 1996).
95. Trindade, P.S. et al Anticorpos anti Brucella abortus em humanos expostos a fator de risco ocupacional. *Universidade Federal do Rio Grande – FURG* (2008).at
<<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0794-2.pdf>>
96. da Silva Ribeiro, V. et al. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. *Immunology letters* **129**, 94-9 (2010).
97. Goldbaum, F.A. et al. The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species - an antigen useful for diagnosis - is a lumazine synthase. *Biochemistry* **48**, 833-839 (1999).
98. Tabatabail, L.B. & Hennager, S.G. Cattle Serologically Positive for Brucella abortus Have Antibodies to B . abortus Cu-Zn Superoxide Dismutase. *Microbiology* **1**, 506-510 (1994).
99. Goldbaum, F.A., Leoni, J., Wallach, J.C. & Fossati, C.A. Characterization of an 18-Kilodalton Brucella Cytoplasmic Protein Which Appears To Be a Serological Marker of Active Infection of Both Human and Bovine Brucellosis. **31**, 2141-2145 (1993).
100. Baldi, P.C. et al. Humoral Immune Response against Lipopolysaccharide and Cytoplasmic Proteins of Brucella abortus in Cattle Vaccinated with B . abortus S19 or Experimentally Infected with Yersinia enterocolitica Serotype 0: 9. *Microbiology* **3**, 472-476 (1996).
101. Velikovsky, C.A. et al. Brucella Lumazine Synthase Elicits a Mixed Th1-Th2 Immune Response and Reduces Infection in Mice Challenged with Brucella abortus 544 Independently of the Adjuvant Formulation Used. *Society* **71**, 5750-5755 (2003).
102. Velikovsky, C.A. et al. A DNA Vaccine Encoding Lumazine Synthase from Brucella abortus Induces Protective Immunity in BALB / c Mice. *Society* **70**, 2507-2511 (2002).
103. Modulation of immune responses in Balbc mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine.pdf.
104. Kennedy, M.W., McIntosh, A.E., Blair, A.J. & McLaughlin, D. MHC (RT1) restriction of the antibody repertoire to infection with the nematode Nippostrongylus brasiliensis in the rat. *Immunology* **71**, 317-322 (1990).
105. Svetić, A., Jian, Y.C., Lu, P., Finkelman, F.D. & Gause, W.C. Brucella abortus induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by

- elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *International Immunology* **5**, 877-883 (1993).
106. Phillips, M., Deyoe, B.L., Canning, P.C. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen. *American Journal of Veterinary Research* **50**, 2158–2161 (1989).
 107. Carvalho Neta, A.V. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary journal (London, England: 1997)* **184**, 146-55 (2010).
 108. Barquero-Calvo, E. et al. *Brucella abortus* Uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection. *PLoS ONE* **2**, 14 (2007).
 109. Salcedo, S.P., Maechesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P., Gorvel, J.P. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. (2008).
 110. Wallis, R.S. Reactivation of latent tuberculosis by TNF blockade: the role of interferon gamma. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* **12**, 16-21 (2007).
 111. Koch, T. et al. Alterations of bacterial clearance induced by endotoxin and tumor necrosis factor. *Infection and immunity* **61**, 3143-8 (1993).
 112. Kursar, M. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* **178**, 2661-2665 (2007).