



Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Campus Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Departamento de Fármacos e Medicamentos
Laboratório de Biotecnologia

Denise Medeiros Selegato

Proposição de uma Nova Vacina para Brucelose Bovina Usando uma
Abordagem Biotecnológica

Araraquara, 2013

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Campus Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Fármacos e Medicamentos

Laboratório de Biotecnologia

Denise Medeiros Selegato

Proposição de uma Nova Vacina para Brucelose Bovina Usando uma
Abordagem Biotecnológica

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Araraquara, 2013

Dedicatória

Dedico este trabalho *in memoriam* à minha avó materna, Hilda de Medeiros Ribeiro, esposa, mãe e avó dedicada, que me ensinou a importância da disciplina, compreensão e paciência, sempre com muito carinho e bom humor.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Sérgio e Regina Selegato, pela determinação e luta na minha formação e criação, pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos da minha vida, pela confiança que sempre depositaram em mim e por sempre estarem presentes em todos os aspectos da minha vida. Sou eternamente grata a vocês.

Agradeço aos meus irmãos, Marcos e Sérgio Selegato, que, por mais difícil que sejam as circunstâncias, sempre estão ao meu lado.

Agradeço aos meus avós paternos e padrinhos, Dorothy e Octacílio Selegato pela convivência e carinho que sempre me proporcionaram.

Agradeço ao meu melhor amigo e companheiro Victor Pavani pelo incentivo, apoio e estímulo para enfrentar os obstáculos durante o caminho, pelo amor e confiança que sempre me passou e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço a minha querida orientadora, Profa. Dra. Rosemeire Pietro que, com paciência e carinho, conseguiu corrigir e me orientar nos meus intermináveis textos, por sempre estar presente nos meus momentos de confusão e dúvida e por ser uma excelente profissional, a qual admiro e me espelho.

Agradeço aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que sempre se mostraram competentes e solícitos.

Agradeço a todos os amigos pela paciência, ternura, amizade e convivência durante esses 6 anos, que serão infindáveis.

Agradeço ao veterinário Luis Octávio Pereira Lima pela ideia inicial do projeto, orientação e paciência.

E finalmente, agradeço a Deus, por permitir que todas essas pessoas maravilhosas entrassem e permanecessem na minha vida, por sempre me desafiar a ser melhor, batalhar e vencer e mesmo a cair, perder e me reerguer. Viver é minha forma de agradecê-lo sempre.

“...the sea's only gifts are harsh blows and, occasionally, the chance to feel strong. Now, I don't know much about the sea, but I do know that that's the way it is here. And I also know how important it is in life not necessarily to be strong but to feel strong, to measure yourself at least once, to find yourself at least once in the most ancient of human conditions, facing blind, deaf stone alone, with nothing to help you but your own hands and your own head.”

- Primo Levi

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Mercado Mundial de Vacinas	16
1.2. Mercado Mundial de Bovinos	18
2. OBJETIVO	21
3. DESENVOLVIMENTO	22
3.1. Revisão Bibliográfica Sobre a Vacinação Contra Brucelose Bovina	22
3.1.1. Mercado Brasileiro de Vacinas	22
3.1.2. Biotecnologia na Produção de Vacinas	28
3.1.3. Brucelose Bovina	29
3.1.4. Etiologia da <i>Brucella</i>	30
3.1.5. Histórico da Brucelose no Mundo	33
3.1.6. Histórico da Brucelose no Brasil	34
3.1.7. Incidência da Brucelose Bovina	35
3.1.8. Transmissão da Brucelose Bovina	37
3.1.9. Patogenia da <i>Brucella</i>	41
3.1.10. Sinais Clínicos e Lesões na Brucelose	43
3.1.11. Perdas Econômicas Relacionadas a Brucelose	45
3.1.12. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)	46
3.1.13. Controle e Profilaxia da Brucelose Bovina	47
3.1.13.1. Vacinação (Vacina B19)	47
3.1.14. Diagnóstico para Brucelose Bovina	48
3.1.15. Resposta Imune contra a Brucelose na Infecção e na Vacinação	50
3.1.15.1. Resposta Imune Inata	51
3.1.15.2. Resposta Imune Adaptativa	53
3.1.15.3. Citocinas	55
3.1.16. Antígenos da <i>Brucella sp</i>	57

3.1.16.1. Lipopolissacarídeos (LPS)	57
3.1.16.2. Proteínas	60
3.1.16.2.1. Proteínas de Membrana Externa	60
3.1.16.2.2. Proteínas Citoplasmáticas e Ribossomais	60
3.1.16.2.2.1. Proteína Superóxido Dismutase (SOD)	61
3.1.16.2.2.2. Catalase	61
3.1.16.2.2.3. Lumazina Sintetase	62
3.1.16.2.2.4. Proteína Ribossomal L7/L12	62
3.1.16.2.3. Proteínas de Choque Térmico	63
3.1.17. Genética da <i>Brucella</i>	63
3.1.18. Vacinas contra <i>Brucella abortus</i>	64
3.1.18.1. Vacinas de Bactérias Vivas Atenuadas	65
3.1.18.1.1. <i>Brucella abortus</i> B19	65
3.1.18.1.2. Brucelina RB51	68
3.1.18.1.3. REV1	71
3.1.18.2. Vacinas de Bactérias Mortas	71
3.1.18.2.1. <i>Brucella abortus</i> 45/20	71
3.1.18.2.2. Vacina H 38 (Cepa Morta por Formol)	72
3.1.18.2.3. P. B. <i>B. abortus</i> S19 (Cepa Morta por Calor)	72
3.1.19. Novas Tendências na Geração de Vacina para Brucelose	72
3.1.19.1. Vacinas Subcelulares	72
3.1.19.2. Vacinas de DNA	74
3.1.19.3. Vacinas de RNA	75
3.2. Proposição de um Processo Biotecnológico para a Produção de Antígenos Purificados Usados em Vacina Contra <i>Brucella abortus</i>	76
3.2.1. Processo de Produção de uma Vacina	76
3.2.2. Processo de Upstream	77
3.2.2.1. Identificação do Alvo	77
3.2.2.1.1. Proteína Ribossomal L17/L12	77

3.2.2.1.1.1. Imunogenicidade	77
3.2.2.1.1.2. Gene rplL	78
3.2.2.1.2. Lumazina Sintetase	78
3.2.2.1.2.1. Imunogenicidade	78
3.2.2.1.2.2. Gene ribH	79
3.2.2.2. Escolha do Vetor de Clonagem – Vetor Plasmidial pUC 19	79
3.2.2.3. Escolha do Sistema Vivo de Expressão	82
3.2.2.4. Formação do Gene de Interesse	83
3.2.2.4.1. Amplificação dos Genes ribH	83
3.2.2.4.2. Amplificação do Gene rplL e Remoção do Códon de Terminação	84
3.2.2.4.3. Fusão dos Genes das Proteínas Recombinantes	85
3.2.2.4.4. Inserção do Gene de Fusão no Vetor de Clonagem	85
3.2.2.5. Formação de Células Hospedeiras Competentes	87
3.2.2.6. Transformação (Vetor de Clonagem)	87
3.2.2.7. Métodos de Seleção de Recombinantes	88
3.2.2.8. Cultivo das Células Transformadas	88
3.2.2.9. Extração de Plasmídios Bacterianos	89
3.2.2.10. Escolha do Vetor de Expressão e Célula Hospedeira	90
3.2.2.11. Transformação (Vetor de Expressão)	93
3.2.2.12. Métodos de Seleção de Recombinantes	93
3.2.2.13. Expressão Proteica	94
3.2.3. Processo de Downstream	98
3.2.3.1. Clarificação	98
3.2.3.2. Rompimento Celular	98
3.2.3.3. Purificação e Solubilização das Proteínas	99
3.2.3.4. Caracterização da Proteína Obtida	100
3.2.3.5. Teste de Atividade	101
3.2.3.5.1. Imunização de Camundongos BALB/c	101

3.2.3.5.2. Determinação de Anticorpos Específicos	101
3.2.3.5.3. Determinação da Proliferação de Linfócitos e INF-gama	104
3.2.3.5.4. Determinação da Produção de Citocinas	107
4. CONCLUSÃO	107
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
6. ANEXOS	124
6.1. Anexo I	124
6.2. Anexo II	125
7. DADOS FINAIS	126

Resumo

A utilização de novas tecnologias empregando a biologia molecular busca superar os principais problemas encontrados nas vacinas atualmente comercializadas no combate à brucelose bovina. Desta forma, a identificação de proteínas imunogênicas e a posterior transformação dos genes correspondentes em micro-organismos competentes tem sido um dos principais alvos para o desenvolvimento de novas formas de controle da infecção. O presente trabalho tem como objetivo propor, em base teórica, uma vacina de eficácia e segurança superiores às encontradas atualmente no mercado contra a brucelose bovina, antroponose contagiosa provocada principalmente pela espécie *Brucella abortus*. Essa enfermidade produz infecção característica em bovinos e bubalinos e é infecciosa ao homem, causando doença crônica que leva à incapacidade parcial ou total para o trabalho. Por ter distribuição universal, acarreta problemas sanitário e de saúde pública importantes e grandes prejuízos econômicos. A vacina proposta visa o desenvolvimento de micro-organismos transformados contendo genes de proteínas de potencial imunológico que, após purificação, são usadas para o combate da doença. As proteínas recombinantes abordadas no presente estudo são as proteína ribossomal L7/L12 e a lumazina sintetase que, ao serem utilizadas em uma vacina subcelular, diferente das comercializadas atualmente, induzem resposta de longa duração, não induzem a produção de anticorpos que interfiram no diagnóstico e não são patogênicas ao homem.

Palavras-chave: biotecnologia, brucelose bovina, vacina.

Abstract

*The development of new technologies using molecular biology seeks to overcome the main problems found in vaccines currently used to combat bovine brucellosis. Therefore, the protein identification and its gene transformation in a host microorganism has been a major target for the development of improved method for infection control. This paper aims to propose a theoretical basis for a vaccine with higher efficacy and safety than those currently on the market against bovine brucellosis, a contagious anthroponosis mainly caused by the species *Brucella abortus*. This disease produces a well-known infection in cattle and buffaloes and can be infectious to humans, causing chronic disease that leads to partial or total disability to work. As a universally distributed disease, causes sanitary and public health problems and large economic losses. The proposed vaccine developed from transformed microorganisms contains potential immunogenic proteins, which, after purification, are used to combat the disease. The major recombinant proteins studied in the paper are the ribosomal protein L7/L12 and the enzyme lumazine synthase that, when used in a vaccine, differently of that commercialized nowadays, induce long-term response, are not pathogenic to humans and do not induce the production of antibodies that interfere with diagnostic.*

Keywords: *biotechnology, bovine brucellosis, vaccine.*

Lista de Ilustrações

Figura 01 - <i>Brucella abortus</i> em Meio Ágar Dextrose	32
Figura 02 - <i>Brucella abortus</i> por Iluminação por Luz Transmitida	32
Figura 03 - Prevalência de Focos de Brucelose Bovina nas Unidades Federativas Brasileira	37
Figura 04 - Aborto no Último Trimestre da Gestação	44
Figura 05 - Orquite Unilateral em Machos Brucélicos em Idade Reprodutiva	44
Figura 06 - LPS da Cepa Lisa de <i>Brucella abortus</i>	58
Figura 07 - Resposta Imunológica Humoral de Animais Infectados com Cepa Silvestre de <i>Brucella abortus</i>	66
Figura 08 - Resposta Imunológica Humoral de Bovinos Vacinados com B19	67
Figura 09 - Resposta Imunológica Humoral a Longo Prazo de Bovinos Vacinados com a Vacina B19	67
Figura 10 - Vetor de Clonagem pUC 19	81
Figura 11 – Esquema de Formação do Gene de Fusão e Inserção no Vetor de Clonagem	86
Figura 12 - Vetor de Expressão pET 30a(+)	91
Figura 13 - SDS-Page de Diferentes Amostras da Fermentação	96
Figura 14 - Fluxograma de Crescimento Celular	97
Figura 15 - Caracterização da Produção de Anticorpos por Ensaio de ELISA	103
Figura 16 - Estimulação de Linfócitos Após Imunização com Vacina de DNA contra <i>B. abortus</i>	105
Figura 17 - Produção de IFN-gama Após Imunização de Camundongos BALB/c	106

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Produção de Insumos Veterinários Segundo a Espécie Animal no Brasil	19
Tabela 02 - Lucratividade dos Insumos Veterinários Produzidos para Cada Espécie Animal no Brasil	20
Tabela 03 - Produção e Comércio Mundial de Carne Bovina em 2010 (milhões de toneladas)	21
Tabela 04 - Valores do PIB do Agronegócio Brasileiro, 1994 a 2011, em R\$ Milhões	23
Tabela 05 - Evolução do Faturamento da Indústria de Saúde Animal no Brasil	24
Tabela 06 - Participação Relativa dos Produtos no Mercado Mundial de Saúde Animal no Brasil	25
Tabela 07 - Faturamento Total e no Setor de Vacinas das Indústrias de Produtos para a Saúde Animal	26
Tabela 08 - Resistência de <i>Brucella sp</i> em Diferentes Condições Ambientais	39
Tabela 09 - Diagnóstico Sorológico em Função do Estado Evolutivo da Brucelose Bovina	50
Tabela 10 - Principais Citocinas Atuantes na Infecção por <i>Brucella</i>	56
Tabela 11 - Principais Diferenças Entre as Vacinas de Bactérias Atenuadas Utilizadas no Combate à Brucelose Bovina	70
Tabela 12 - <i>Primers</i> para Amplificação do gene ribH por PCR	84
Tabela 13 - <i>Primers</i> para Amplificação do gene rplL por PCR	84
Tabela 14 - Enzimas de Restrição	86

Lista de Abreviaturas e Siglas

2-ME	2-Mercaptoetanol
<i>amp^r</i>	Gene de Resistência a Ampicilina
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High-performance Liquid Chromatography</i>)
CNA	Confederação Nacional da Agricultura
CPQ	Carboxiprimaquinase
DNAc	DNA Complementar
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FC	Fixação de Complemento
GTP	Trifosfato de Guanosina
HAP	Homogeneizador de Alta Pressão
HtrA	<i>High Temperature Requirement A Stress Response Protein</i>
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund (<i>incomplete Freund's adjuvant</i>)
IL	Interleucina
INF-gama/ INF- γ	Interferon Gama
IPTG	Isopropil-tio- β -galactosídeo
kDa	Kilo Daltons
Kpb	Mil Pares de Base
<i>lac Z</i>	Gene que Codifica a Enzima Beta-galactosidade
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCS	Sítio de Clonagem Múltipla (<i>multiple cloning site</i>)

MDIC	Ministério Brasileiro do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MPA	Lipídeo A Monofosforilado (<i>monophosphoryl lipid A</i>)
NFKB	<i>Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (nuclear factor kappa B)</i>
NK	Natural Killer
OD	Densidade Óptica
OIE	Organização Mundial de Sanidade Animal - Organização Internacional de Epizootias
OMP	Proteínas de Membrana Externa (<i>outer membrane protein</i>)
Ori	Origem de Replicação
PBS	Solução Salina Tamponada.
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PMSF	Fluoreto de Fenil-metil-sufonil
RNA _m	RNA mensageiro
<i>ribH</i>	Gene que Codifica a Enzima Lumazina Sintetase (<i>B. abortus</i>)
<i>rplL</i>	Gene que Codifica a Proteína 50S ribossomal L7/L12 (<i>B. abortus</i>)
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa, seguida de PCR
SDS	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
SFV	<i>Vírus Semliki Forest</i>
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
SOD	Superóxido Dismutase Cu/Zn
TAL	Teste do Anel em Leite
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α /TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mercado Mundial de Vacinas

A medicina veterinária, apesar de presente em todos os países do mundo, ganha destaque maior naqueles cujo agronegócio é a fonte primária na composição da riqueza nacional. Somado ao fator financeiro, a crescente demanda mundial por alimentos de qualidade e a reconhecida deficiência proteica em diversos países do mundo servem como base fundamental para desenvolvimento deste setor [7].

Cerca de 70% do mercado de produtos veterinários mundial está no poder de países desenvolvidos. Apesar disso, o Brasil entra neste cenário como o terceiro maior, atrás apenas dos Estados Unidos da América e Japão [21]. A participação do país no mercado agropecuário internacional mostra crescimento significativo, principalmente na produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estima-se que até 2020, a produção brasileira de carne de frango atenderá 48,1% da demanda mundial, seguido da carne bovina, com 44,5% e a carne suína, com 14,2%. Essas estimativas mantêm o Brasil em primeiro lugar na exportação destes produtos, promovendo grande visibilidade fiscal e controle na qualidade e segurança destas mercadorias [20].

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), o mercado mundial de saúde animal vem evoluindo de forma significativa, atingindo lucratividade de 20 bilhões de dólares em 2012, aumento de 7,8% com relação ao ano anterior [1]. Este mercado apresenta como principal característica a alta competitividade e é controlado diretamente pela relação

custo/benefício, sem qualquer preocupação com a função social, como acontece nas indústrias farmacêuticas voltadas para medicamentos para humanos [21].

Como exemplo de liderança e crescimento das principais multinacionais do setor veterinário, pode-se citar a Pfizer Saúde Animal, que triplicou suas instalações e teve lucratividade de R\$ 592 milhões em 2011 e a MSD Saúde Animal, formada da fusão da Merck & Co., Inc. e a Schering- Plough Corporation, que terminou com um crescimento de 21,2% em 2010. Somente no mercado brasileiro, as vendas de medicamentos e produtos biológicos da Pfizer Saúde Animal atingiu a marca de R\$ 332 milhões [22].

Os principais fatores que contribuíram para esse crescimento do mercado mundial estão relacionados com o aumento das vendas mundiais de vacinas contra febre aftosa, o surgimento de novos produtos inovadores, a inclusão de vacinas em programas de erradicação nacionais, a presença de um mercado mais organizado e dinâmico, o aumento das vendas no segmento de aves e o aumento da prevalência de zoonoses em humanos [9].

No ano de 2004, os principais vendedores do produto foram Holanda (US\$ 384 milhões), EUA (US\$ 247 milhões) e França (US\$ 161 milhões), de acordo com estudo realizado pela TradeMap [7]. O Brasil aparece na 13ª posição na lista de principais exportadores, com lucratividade atingindo a ordem de US\$ 13 milhões [7].

Se considerarmos a demanda, os países desenvolvidos também são os principais participantes do mercado, sendo, em 2004, a Holanda (US\$ 93 milhões), Reino Unido (US\$ 87 milhões) e Alemanha (US\$ 85 milhões) os principais importadores. O Brasil aparece como 17º importador mundial do produto [7].

Em 2004, o Brasil registrou importações de vacinas que chegaram a 20 milhões de dólares. Segundo o Ministério Brasileiro do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), em 2005, as importações brasileiras atingiram US\$ 26 milhões, apresentando crescimento de 27% [7].

1.2. Mercado Mundial de Bovinos

O rebanho bovino brasileiro é o maior do mundo comercialmente, seguido da China e Estados Unidos da América. Este tipo de criação é duplamente vantajosa, pois permite grande desenvolvimento e lucratividade de dois setores distintos: o da carne e o do leite [3, 24]. A produção leiteira brasileira teve, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), um aumento de 4,5% de 2010 para 2011, totalizando 32 bilhões de litros produzidos [24]. Da mesma forma, a produção de carne também teve crescimento significativo, sendo que o abate de bovinos aumentou em 8,0% de 2011 para 2012, chegando a 31.118 milhões de cabeças abatidas e um valor bruto de R\$ 60,2 bilhões (crescimento real de 6,3% em relação a 2011) [24].

Comparando-se o desempenho da indústria de produtos veterinários por espécies, observa-se que os bovinos apresentam maior porcentagem de participação, principalmente devido a seu grande valor econômico na produção de carne, leite e derivados, como couro e animal de transporte. A Tabela 01 mostra as espécies animais para que as empresas veterinárias mais produzem insumos, em porcentagem, evidenciando o grande potencial mercadológico dos bovinos [1]. Apesar disso, estudos mostram que o grupo PET também merece visibilidade mercadológica, pois é o grupo

de maior expectativa de crescimento, já que o Brasil conta com a segunda maior população de animais de estimação do mundo [27, 21].

**Tabela 01: Produção de Insumos Veterinários Segundo a Espécie Animal
no Brasil**

Espécie Animal	Porcentagem da Produção (%)				
	2008	2009	2010	2011	2012
Ruminantes	56,7	54,3	57,1	56,6	54,2
Aves	16,4	17,0	15,6	15,3	15,6
Suínos	14,5	16,4	14,3	14,7	15,0
Cães e Gatos (PET)	10,8	10,6	11,3	11,8	13,6
Equinos	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5
Outros	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Fonte: Comissão de Inteligência de Mercado - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 2012.

Já a Tabela 02 mostra a lucratividade dos insumos veterinários produzidos para cada espécie animal, em milhões de reais, evidenciando uma lucratividade de cerca de 1,98 milhões de reais para bovinos em 2012 [1].

**Tabela 02: Lucratividade dos Insumos Veterinários Produzidos para Cada
Espécie Animal no Brasil**

Espécie Animal	Porcentagem da Produção (%)	Valor da Produção
Ruminantes	54,2	R\$ 1,98 milhões
Aves	15,6	R\$ 0,57 milhões
Suínos	15,0	R\$ 0,54 milhões
Cães e Gatos (PET)	13,6	R\$ 497,76 mil
Equinos	1,5	R\$ 54,9 mil
Outros	0,1	R\$ 3,66 mil

Fonte: Comissão de Inteligência de Mercado - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 2012.

Quando comparado em número de cabeças, o Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, atrás somente da Índia, cuja criação não tem cunho comercial [27]. Segundo dados do IGBE, o mercado brasileiro contou com 212,8 milhões de cabeças, em 2011 [24]. A Tabela 03 mostra a produção e comércio mundial de carne bovina em 2010, indicando liderança da América Latina, principalmente o Brasil e Uruguai, na produção, exportação e consumo de carne bovina. Este fato deve-se principalmente a maior produção, maior exportação e menor preço do produto no mercado brasileiro.

Tabela 03: Produção e Comércio Mundial de Carne Bovina em 2010 (milhões de toneladas)

País	Produção	Importação	Exportação	Consumo
Ásia	15.279	2.673	811	17.141
África	4.807	542	72	5.277
América Central	2.460	444	203	2.701
América Latina	15.708	350	2.686	13.053
América do Norte	13.085	1.422	1.454	13.053
Europa	10.829	1.473	344	11.958
Oceania	2.705	47	1.710	1.042
TOTAL	64.874	6.951	7.281	64.544

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo propor, em base teórica, um processo biotecnológico otimizado de produção de ativos purificados para serem usados em uma vacina contra brucelose bovina que supere as desvantagens observadas nas atualmente comercializadas.

O processo proposto tem abordagem biotecnológica, pois visa o desenvolvimento de micro-organismos transformados contendo genes de proteínas de potencial imunológico que, após purificação, são usadas para o combate da doença. As principais proteínas recombinantes são a proteína ribossomal L7/L12 e a enzima lumazina sintetase que, ao serem utilizadas juntas em uma vacina, diferente das presentes na atualidade, induzem resposta de longa duração, não induzem a produção

de anticorpos que interfiram no diagnóstico, não são patogênicas ao manipulador e não causam aborto em vacas prenhas.

Para tanto, o presente trabalho propõe uma revisão bibliográfica sobre o assunto, bem como define um método para desenvolvimento do processo de fermentação, *upstream* e *downstream* na produção destes antígenos imunodominantes.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Revisão Bibliográfica Sobre a Vacinação Contra Brucelose Bovina

3.1.1. Mercado Brasileiro de Vacinas

Como apresentado na Tabela 04, o agronegócio (agricultura + pecuária) foi, em 2011, responsável por cerca de 20% do Produto Interno Bruto (PIB) do país (R\$917.654,00 dos 4.143.013,00 milhões) e representa um dos principais propulsores da atividade econômica brasileira.

Nos últimos anos, o país teve um crescimento maior que 100% no saldo comercial do agronegócio, atingindo US\$ 67,9 bilhões em 2011, com exportações de US\$ 78,5 bilhões e importações de US\$ 10,6 bilhões, segundo a Confederação Nacional da Agricultura (CNA) e a RC Consultores [24].

Tabela 04: Valores do PIB do Agronegócio Brasileiro, 1994 a 2011, em R\$ Milhões

Ano	PIB Brasil	Agricultura + Pecuária	Pecuária	% do Agronegócio no PIB Nacional
1994	2,451,463	648,210	180,615	26.44
1995	2,559,740	667,151	191,161	26.06
1996	2,614,787	656,324	184,549	25.10
1997	2,703,044	650,523	177,867	24.06
1998	2,703,999	654,293	185,772	24.19
1999	2,710,870	666,349	197,259	24.58
2000	2,827,605	667,003	207,456	23.58
2001	2,864,735	678,655	210,347	23.68
2002	2,940,882	738,429	220,245	25.10
2003	2,974,603	786,685	228,865	26.44
2004	3,144,521	806,781	232,805	25.65
2005	3,243,877	769,203	228,392	23.71
2006	3,372,239	772,684	217,639	22.91
2007	3,577,656	833,666	240,977	23.30
2008	3,762,678	886,084	263,848	23.54
2009	3,750,271	834,316	245,525	22.24
2010	4,032,805	879,116	262,060	21.79
2011	4,143,013	917,654	278,806	22.14

Fonte: Cepea-USP/CNA. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>. Acessado em: 07/08/2012.

O crescimento do agronegócio no PIB nacional reflete também nas indústrias de produção de insumos veterinários. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), somente no ano de 2012, as indústrias nacionais de produção de insumos veterinários obtiveram um faturamento global de R\$ 3,660 bilhões, 9,5% superior a 2011, quando faturou R\$ 3,5 bilhões [1], como mostrado na Tabela 05.

Tabela 05: Evolução do Faturamento da Indústria de Saúde Animal no Brasil

Ano	R\$ Bilhões	Variação Anual (%)	US\$ Milhões
2000	1.413,0	-	771,5
2001	1.502,5	6,3	636,6
2002	1.713,7	14,1	596,3
2003	1.869,2	9,1	614,1
2004	2.058,2	10,1	706,5
2005	2.210,8	7,4	917,5
2006	2.365,6	7,0	1.071,2
2008	2.513	-	1.3732,2
2009	2.693	9,33	1.21
2010	2.985	10.8	1.35
2011	3.506	16.3	1.58
2012	3.660	9,57	2.00

Fonte: Comissão de Inteligência de Mercado - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 2012.

Diante da posição que o país ocupa no cenário agropecuário mundial, a medicina veterinária – e o setor de vacinas, especialmente – vem apresentando crescimento único, evoluindo positivamente na lucratividade de empresas públicas e privadas. A Tabela 06 mostra a distribuição do mercado farmacêutico veterinário por classes terapêuticas produzidas. Observa-se que mais de 50% do mercado é voltado para produtos biológicos e antimicrobianos, que são produzidos principalmente para atender ao aumento da produção de carnes no país [9].

Tabela 06: Participação Relativa dos Produtos no Mercado Mundial de Saúde Animal no Brasil

Grupo de Produtos	Participação %		
	2008	2010	2012
Biológicos	33	32	27
Antiparasitários	24	24	41
Antimicrobianos	19	17	19
Terapêuticos	8	8	10
Suplementos	5	5	7
Outros	11	12	12

Fonte: Comissão de Inteligência de Mercado - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 2012.

Sabe-se que a saúde animal está diretamente relacionada com a saúde humana, seja pelo cuidado exigido na segurança dos criadores, como para obtenção de proteínas para a alimentação humana. O Brasil não tem medido esforços para melhorar a sanidade animal, a fim de aumentar a produtividade, erradicar infecções que diminuam a lucratividade do produtor e melhorar a qualidade de vida e bem estar animal, sempre respaldado por diretrizes e recomendações elaborados pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), como o “*OIE Guiding Principles on Animal Welfare*”, elaborado em 2004 [2]. Esta organização também foi, em 1990, responsabilizada pelo Comitê Internacional, a listar países-membros ou zonas oficialmente reconhecidas como livres de determinadas enfermidades, como a

brucelose bovina [2], ação de fundamental importância para garantir qualidade e aumentar a confiabilidade na exportação. Para algumas doenças a OIE estabelece níveis distintos quanto ao risco de contaminação de rebanhos.

Como mostrado na Tabela 07, segundo dados da Comissão de Inteligência de Mercado (COINF-SINDAN), o comércio nacional de vacinas para a medicina veterinária apresentou evolução geral positiva nos últimos anos. A exceção foi o ano de 2011, em que houve uma queda na venda de vacinas contra a febre aftosa devido, principalmente, a entrada de novas indústrias no mercado veterinário. Este fato, associado a baixa estabilidade das vacinas (baixo prazo de validade), obrigou as empresas a diminuírem os preços dos produtos, a fim de desovar a produção, diminuindo o faturamento geral destas.

Tabela 07: Faturamento Total e no Setor de Vacinas das Indústrias de Produtos para a Saúde Animal

Ano	Faturamento Total (bilhões)	Faturamento no Setor de Vacinas (bilhões)	% do Faturamento no Setor de Vacinas
2008	2,513	0,829	33
2009	2,693	0,834	31
2010	2,935	0,939	32
2011	3,506	1,051	30
2012	3,660	0,9882	27

Fonte: Comissão de Inteligência de Mercado - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), 2012.

Os principais fatores que contribuíram para esse crescimento do mercado nacional de produtos para saúde animal estão relacionados com o aumento da

comercialização de vacinas contra febre aftosa, o surgimento de novos produtos inovadores (principalmente pelo desenvolvimento da biotecnologia), a adesão de vacinas contra zoonoses infecciosas como para brucelose bovina e raiva nos programas de erradicação do MAPA, a presença de um mercado mais dinâmico, o aumento das vendas no segmento de aves e o aumento da prevalência de zoonoses em humanos [9].

Em termos regulatórios, o Governo Brasileiro, por meio do MAPA, vem trabalhado com a fiscalização e normatização para os trabalhos em produção e comercialização de produtos veterinários, objetivando-se o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), publicando, até o momento, duas instruções normativas e o decreto 5.053 de 2004 [28]:

- Instrução Normativa nº 13, de 3 de Outubro de 2003, em que aprova o Regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Veterinários.
- Instrução Normativa nº 31, de Maio de 2003, aprovando o Regulamento Técnico para Produção, Controle e Emprego de Vacinas Autógenas;
- Decreto nº 5.053 em abril de 2004, que aprovou o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, conferindo poder ao MAPA para a aplicação e a fiscalização, entre outras, da Instrução Normativa no 13.

Para garantir bom funcionamento de sua legislação, o MAPA mantém auditorias frequentes nas indústrias, além de promover revisões constantes na sua legislação. Dessa forma, para cada lote produzido de vacinas, aplica-se testes biológicos contra as

principais zoonoses de interesse econômico ou de saúde pública, como para as vacinas contra a raiva, febre aftosa, brucelose, clostridiais, dentre outras. Estes lotes só são liberados para comercialização após aprovação nos testes oficiais [28].

Com o aumento da fiscalização e das exigências legais para a fabricação das vacinas veterinárias, foi necessário que as empresas se adequassem as novas normas, com mudança em toda cadeia produtiva, desde a qualificação de fornecedores de matérias-primas, compra, limpeza e calibração de equipamentos e instrumentos, até projetos nas plantas produtivas, meio ambiente, comércio e marketing [25].

Associado ao aumento das exigências, as indústrias veterinárias a competitividade crescente do setor, principalmente devido ao forte desenvolvimento tecnológico, derivado, na sua maioria, do desenvolvimento da biotecnologia [25].

3.1.2. Biotecnologia na Produção de Vacinas

Nos últimos 20 anos, as técnicas de biologia molecular e da biotecnologia em si evoluíram tanto a nível molecular, como nas etapas de purificação e *upstream*. Esse desenvolvimento possibilitou maior entendimento dos processos biológicos a nível molecular, permitindo a adequação deste processos de modelos naturais para formas artificiais de produção [29].

Dentro da produção de insumos para saúde animal, a produção de imunobiológicos, como vacinas, vem crescendo de maneira constante, sendo responsável, em 2012, por quase 30% do lucro total das indústrias nacionais, valor que chega a cerca de 1 bilhão de reais [01]. Novos métodos e protocolos para produção em

larga escala, cultivos celulares enriquecidos; tecnologia de manipulação e inativação de células hospedeiras e agentes infecciosos, desenvolvimento de bons adjuvantes imunológicos e evolução da biologia molecular são alguns dos fatores responsáveis para esse constante crescimento do setor [28, 30].

A biotecnologia tem maior representatividade nos setores de agricultura (22%), insumos (22,1%) e saúde animal (18,3), respectivamente [6]. Para a saúde animal, os produtos imunobiológicos são os que apresentam maior desenvolvimento na área, principalmente devido a vantagens que este processo confere, como a padronização e qualidade de produção formada, proteção imunológica do animal de forma mais eficaz, adequação de dosagens, baixa porcentagem de reações pós-vacinais indesejáveis, facilidade e segurança durante a aplicação e custo compatível [6]. Como exemplos, pode-se citar kits de diagnóstico, vacinas ou outros produtos terapêuticos, transferência de embriões, melhoramento genético, clonagem, diagnóstico molecular [6].

3.1.3. Brucelose Bovina

A brucelose é uma antroponose conhecida, em animais, como doença de Bang, aborto contagioso ou aborto infeccioso, e, em humanos, como febre ondulante, doença das mil faces, febre de Malta, febre de Gibraltar, febre intermitente do Mediterrâneo, febre de Bang, febre napolitana ou melitococia [32]. Essa enfermidade contagiosa é provocada por bactérias do gênero *Brucella* e produz infecção

característica das células do sistema mononuclear fagocitário em diversos animais, como bovinos, suínos e bubalinos, bem como o homem [68].

Por ter distribuição universal e fácil contágio, leva a problemas sanitários preocupantes, bem como consideráveis prejuízos econômicos, principalmente relativo à produção pecuária que, por ser um produto vulnerável às barreiras sanitárias, compromete sua competitividade no comércio internacional [34, 36].

Para animais, principalmente bovinos e bubalinos, as manifestações mais comuns são abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa produção de leite. No homem, é considerada uma doença crônica e se manifesta clinicamente por febre contínua, intermitente ou irregular, de duração variável e é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho, sendo caracterizada como uma doença crônica [32].

3.1.4. Etiologia da *Brucella*

O gênero *Brucella* tem diferentes espécies identificadas pelo seu hospedeiro preferencial [32]:

- *Brucella abortus*, cujos hospedeiros preferenciais são bovinos e bubalinos e apresentam os biótipos de 1 a 6 e 9;
- *Brucella melitensis*, cujos hospedeiros preferenciais são caprinos e ovinos e apresentam os biótipos de 1 a 3;
- *Brucella suis*, cujo hospedeiro preferencial é o suíno e apresentam os biótipos de 1 a 5;

- *Brucella ovis*, cujo hospedeiro preferencial é o ovino;
- *Brucella canis*, cujo hospedeiro preferencial é o cão;
- *Brucella neotomae*, cujo hospedeiro preferencial é o rato do deserto.

Recentemente, identificaram-se novas espécies, como a *Brucella ceti*, cujos hospedeiros preferenciais são golfinhos e baleias e *B. pinnipedialis*, em focas e leões marinhos [35].

As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos, com morfologia de cocobacilos gram-negativos não-capsulados, imóveis. Estes micro-organismos são curtos, com 0,5-0,7 x 0,5-1,55 μm e arranjam-se em forma individual ou em cadeias curtas, ou em pequenos grupos [10, 32, 33].

Podem apresentar-se em cultivos primários em colônias lisa ou rugosa (rugosa estrita ou mucóide), dependendo da composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular e a maior parte dos cultivos requer gás carbônico suplementar para seu crescimento [32]. *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* apresentam morfologia de colônia do tipo lisa e tem o LPS como um fator determinante de virulência. Por isso, quando se transformam para formas rugosas ou mucóides, deixam de ser patogênicas. Já as espécies *B. ovis* e *B. canis* apresentam morfologia rugosa ou mucóide [10].

Produzem a enzima nitrato redutase e um sistema de transporte de elétrons que se baseia no complexo do citocromo, sendo o nitrato ou oxigênio o aceptor final de elétrons [32].

As colônias em ágar dextrose ou meio semelhante são transparentes, elevadas, convexas com bordas inteiras, lisas e com superfície brilhante, como mostrado na

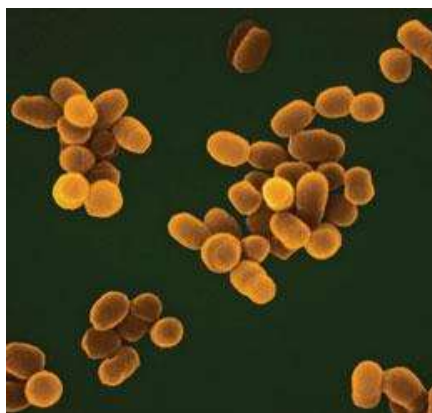
Figura 01 e possuem cor de mel quando iluminadas com luz transmitida, como mostrado na Figura 02. A temperatura ótima para seu crescimento é de 37° C, variando de 20 a 40° C, e seu pH ótimo é de 6,6 a 7,4 [32, 34].

Figura 01: *Brucella abortus* em Meio Ágar Dextrose



Fonte: *Unauthorized Brucellosis experiments*, University of Wisconsin, Madison. Disponível em: <http://www.fas.org/blog/nutshell/2010/05/unauthorized-brucellosis-experiments-university-of-wisconsin-madison/>. Acessado em: 23/10/12.

Figura 02: *Brucella abortus* por Iluminação por Luz Transmitida



Fonte: Nature - *International weekly journal of science*. Disponível em: <http://www.nature.com/news/2008/080206/full/451618b.html>. Acessado em: 23/10/12.

3.1.5. Histórico da Brucelose no Mundo

A doença, apesar de ser conhecida desde o século V a.C., só foi inicialmente estudada em 1886 pelo médico inglês David Bruce, que analisou, na ilha de Malta, uma doença febril que acometia soldados ingleses. Por análise microscópica, o pesquisador observou que, nos soldados mortos, existiam milhares de micro-organismos cocóides [37], que se repetiam em forma e tamanho em todos os pacientes. Porém, somente um ano depois, em 1887, foi possível o isolamento, por cultura, deste micro-organismo no baço desses soldados mortos por febre de Malta, que foi denominado *Micrococcus melitenses* [37, 38].

De forma independente, o veterinário e microbiologista Edmund Nocard, em 1885, observou diversos micro-organismos cocóides na placenta, feto e vacas, durante o abortos de vacas prenhas [37]. Dois anos mais tarde, em 1887, Jacob Stribolt e Christiansen Bang isolaram, também por cultura, o organismos presente nos abortos, bacilo denominado *Bacillus abortus infectiosi* [37, 39]. Em 1905, o pesquisador Zammit verificou que era possível isolar esse mesmo micro-organismo no sangue de pessoas infectadas, durante seus picos febris e urina [37].

Em 1918, a pesquisadora norte-americana Alice Evans, em estudo comparativo, provou que os cocóides isolados por Bruce, em 1886 e Bang, em 1887 eram semelhantes e propôs o nome genérico de *Brucella*, homenageando o pesquisador inglês. A semelhança dos cocóides só foi comprovada oficialmente em 1920 [37], que foram denominados, respectivamente, de *B. melitensis* e *B. abortus*.

Concomitantemente com essas pesquisas, Franz von Hutyra isolou, na Hungria, o agente causador do aborto epidêmico que acometeu suínos em 1909 [38].

Jacob Traum, em 1914, isolou, nos EUA, o mesmo micro-organismo responsável pela febre de Malta e os abortos bovinos e suínos observados por Bang em 1887 [37]. Somente em 1928, o pesquisador Huddleson propôs a denominação de uma nova espécie, a *B. suis*, bem como a criação da designação global de brucelose para todas as doenças ocasionadas por esses micro-organismos [39].

Da mesma forma que a *B. suis*, *B. abortus* e *B. melitensis*, as outras espécies atualmente descritas foram isoladas de foram isolada sendo a *B. ovis* descrita em 1953, por Buddle e Boyes, na Oceania; *B. neotomae* em 1957, por Stoenner e Lachman, nos EUA e a *B. canis* em 1966, por Carmichael, nos EUA [37].

Vale ressaltar que a *B. neotomae*, isolada de uma espécie de rato do deserto (*Neotoma lépida*) é uma das únicas espécies de *Brucella* que, até a atualidade, não se mostrou patogênica para os animais domésticos ou homem [37].

3.1.6. Histórico da Brucelose no Brasil

A primeira descrição do cocóide *Brucella* aconteceu em 1914, quando o médico Carlos Danton Seixas diagnosticou, de forma clínica, a febre de Malta no estado do Rio Grande do Sul. Três anos mais tarde, no estado do Ceará, o engenheiro e administrador Thomaz Pompeu Sobrinho observou abortamento constante, porém não epidêmico, de ovinos equinos, em maior proporção, e bovinos, em menor [40].

Realizou-se o primeiro estudo sobre a brucelose bovina em 1922, quando o pesquisador Tineciro Icibaci, por análise de dados epidemiológicos de campo, bem como exames microscópicos de tecidos de fetos abortados, descreveu foco epidêmico na cidade de São Carlos, no interior de São Paulo.

A partir do primeiro estudo, novas pesquisas foram realizadas, encabeçadas principalmente pelos pesquisadores Mello e Neiva que, em 1928, demonstraram a presença definitiva de enfermidade no território brasileiro [41] e Sílvia Torres que, em 1931, confirmou oito animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados [40].

Após os dados epidemiológicos coletados e a verificação da importância do controle desta doença, em 1933, Cézar Pinto propôs a implementação de testes diagnósticos em animais para importação, a fim de impedir a disseminação da doença no país [40]. Desde então, a doença tem sido diagnosticada em todos os estados do país, com maior prevalência nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul [10].

3.1.7. Incidência da Brucelose Bovina

Atualmente, a incidência da brucelose bovina pode ser extrapolada em até cinco vezes os dados oficiais obtidos pelo MAPA, principalmente devido à falta de treinamento e conhecimento dos criadores e profissionais da área, falta de diagnóstico e ao não cumprimento da declaração compulsória [48].

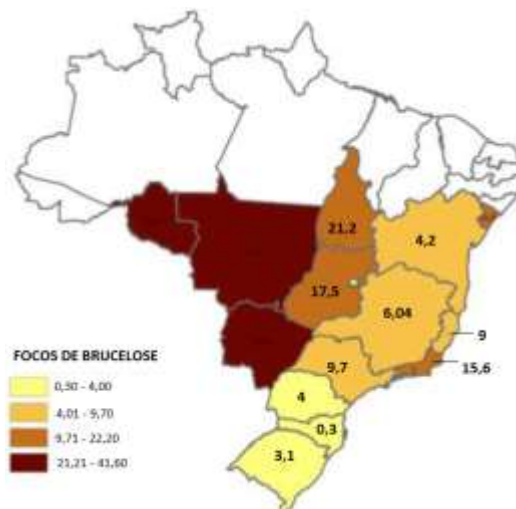
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência global de Brucelose atinge aproximadamente 500.000 animais/ano. A doença é encontrada em diferentes regiões do mundo, sendo mais prevalente no Mediterrâneo, Oriente Médio, Oeste da Ásia, partes da África, subcontinente indiano, Austrália, países da América Central e do Sul e América do Norte [49].

Devido a eficácia de controle e fiscalização de programas de vacinação compulsória de vacas em idade reprodutiva, muitos países obtiveram sucesso no processo de erradicação, entre eles, Estados Unidos, Canadá e Austrália [49].

No Brasil, o primeiro dado epidemiológico foi coletado em 1975 e mostrou que a brucelose bovina encontrava-se disseminada por todo o território nacional com prevalência que variava por regiões, sendo 2,5% no Nordeste, 4% no Sul, 4,1% no Norte, 6,8% no Centro Oeste e 7,5% no Sudeste [10, 49]. Outros levantamentos foram realizados após 1975, constatando baixa ou inexistente melhora na prevalência da infecção, quando comparados com os dados obtidos em 1975 [10, 49, 50].

Os dados de notificação compulsória, publicados nos Boletins de Defesa Sanitária Animal, indicam que a prevalência de animais soropositivos para brucelose manteve-se entre 4% e 5%, no período de 1988 a 1998 [40]. Mais recentemente, estudo realizado em 2004 pelo pesquisador Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, da Universidade de São Paulo (USP), juntamente com o MAPA, mostrou que, mesmo após a implantação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), os focos da doença ainda são heterogêneos entre os Estados brasileiros, mostrando maior prevalência nas tradicionais regiões produtoras de carne na região Centro-oeste. Esses dados podem ser observados na Figura 03, que mostra a prevalência de focos de brucelose bovina nas Unidades Federativas do Brasil [50].

Figura 03: Prevalência de Focos de Brucelose Bovina nas Unidades Federativas Brasileiras



Fonte: Figura adaptada de Ferreira Neto, S.J. Situação Epidemiológica da Brucelose Bovina no Brasil: Bases para as Intervenções [50].

3.1.8. Transmissão da Brucelose Bovina

O modo de penetração no organismo hospedeiro pela *Brucella* ocorre pela mucosa do trato genital, digestivo ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. Para a brucelose bovina, a principal porta de entrada da bactéria é a mucosa oro-faringiana [10, 34, 42].

Quando analisa-se os fatores que controlam a contaminação da doença, observa-se que o sexo e as condições ambientais não tem influência significativa, enquanto a idade é diretamente relacionada, visto que as bactérias são mais infectantes para animais púberes, embora possam ocorrer em impúberes (não atingiram a puberdade) [10, 37, 43, 44].

Nos animais infectados, as localizações mais comuns no organismo são linfonodos, fígado, baço, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero. Desta forma, as principais vias de eliminação sejam fluidos e anexos fetais, fluidos eliminados no parto, fluidos eliminados no abortamento, fluidos eliminados durante todo o puerpério, leite e sêmen [10, 45].

A principal fonte de infecção é representada pela vaca prenha, pois esta elimina grande quantidade de micro-organismo durante o aborto e parto, bem como todo o período puerperal (até cerca de 30 dias após o parto) [10]. Essa forma de eliminação favorece a contaminação por bactérias em pastagens, água, alimentos e material de trabalho, sendo que estas permanecem viáveis por longos períodos, dependendo dos fatores climáticos como umidade, temperatura e luz solar, como mostrado em Tabela 08.

A *Brucella* tem condições de sobreviver em condições naturais diversas, sendo sua resistência diminuída em locais com baixa umidade, ausência de luz ou aumento da temperatura. Porém, apesar de permanecerem viáveis por longo período de tempo, as bactérias que permanecem no ambiente não se multiplicam. A sobrevivência da *Brucella sp* em esterco líquido é inversamente proporcional à temperatura, pois pode sobreviver nesse material por até 08 meses à 15°C, e só resiste por 04 horas à 45-50°C [10].

Tabela 08: Resistência de *Brucella sp* em Diferentes Condições Ambientais

Condição Ambiental	Variáveis	Tempo de Sobrevivência
Luz solar direta	-	4 – 5 horas
Solo	Seco	4 dias
	Úmido	65 dias
	Baixa temperatura	151-185 dias
Fezes	-	120 dias
Dejetos	Esgoto	8 – 240/700 dias
	Altas temperaturas	4 horas – 2 dias
Água	Potável	5 – 114 dias
	Poluída	30 – 150 dias
Fetos à sombra	-	180 dias
Exsudato uterino	-	200 dias

Fonte: Tabela adaptada de Wray (1975) OMS (1986) e Crawford et al (1990) – Obtida em: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal, 2006.

Quando a contaminação ocorre ativamente no meio ambiente, a via de infecção mais significativa é a digestiva, devido, principalmente, a ingestão de água e alimentos contaminados em pastagens, ou por lamber ou cheirar as crias recém-nascidas ou fetos abortados [10].

O tempo de incubação pode ser definido como o tempo entre a exposição à bactéria e o aparecimento de sintomas e, no caso da brucelose bovina, varia de algumas semanas até meses ou anos. O tempo é inversamente proporcional ao tempo de gestação, ou seja, quando mais avançada está a gestação, mais rápido ocorrerá manifestação bacteriana. A transmissão pelo coito não é significativa entre bovinos e bubalinos, pois as defesas inespecíficas na vagina do animal dificultam o processo de infecção. Machos infectados, entretanto, não podem ser doadores de sêmen, pois,

durante a inseminação artificial, o sêmen é introduzido diretamente no útero, impedindo que as barreiras vaginais atuem [10, 45].

Apesar da doença causar grande prejuízo econômico para criadores de gado, na inseminação artificial não existe risco significativo de transmissão entre doadoras infectadas e receptoras sadias. Isto acontece, pois, quando ocorre infecção por inseminação artificial, a transferência de embriões, realizada segundo os protocolos internacionalmente preconiza a lavagem e tratamento para a redução da transmissão de agentes infecciosos, reduzindo o risco de contaminação [10].

Vacas nascidas de mães brucélicas podem infectar-se no útero, durante ou após o parto. Entretanto, quando infectadas, as fêmeas só apresentam resultados sorológicos positivos no decorrer da primeira prenhez, em que é normal o aborto. A contaminação mãe-feto vem tornando-se cada vez mais rara devido principalmente a obrigatoriedade da vacinação de vacas nos primeiros meses de vida, impedindo o avanço da doença e contribuindo para resultados positivos nos programas de controle e erradicação [10, 39, 47].

Uma outra fonte comum de contaminação de bezerros é a ingestão de leite de fêmeas contaminadas, sendo importante a separação do animal sadio do ambiente contaminado [45]. Insetos também podem desempenhar um papel importante na transmissão e prevalência da infecção em rebanho, pois moscas presentes principalmente nos chifres de bovinos e bubalinos transportam e excretam *Brucella* nas fezes [45].

Além disso, um meio importante de transmissão entre criadores é a mão do ordenhador, pois pode transportar bactérias e depositá-las nas superfícies das erosões dos tetos [39].

Vale salientar que, quanto maior a frequência de introdução de animais, maior o risco de entrada da doença no rebanho. Por essa razão, deve-se evitar a compra de animais com condição sanitária desconhecida [10].

3.1.9. Patogenia da *Brucella*

Na brucelose bovina, após a penetração no hospedeiro pela mucosa, principalmente oral e nasal, a bactéria se multiplica no local de entrada e é, em seguida, transportada, livre ou já fagocitada no interior de macrófagos, até os linfonodos regionais, podendo permanecer latente por meses [10, 16, 42, 51, 52]. O estado fisiológico do animal irá direcionar o curso da doença, sendo que o micro-organismo pode tornar-se localizado, ser destruído ou se disseminar para vários órgãos por via hematológica ou linfática [10, 52, 53, 54].

A *Brucella sp* apresenta, como principal vantagem imunológica, resistência aos mecanismos de destruição das células fagocitárias, permitindo sua sobrevivência no interior de macrófagos e neutrófilos por longos períodos. Essa permanência intracelular é um importante mecanismo de evasão do sistema imunológico, pois protege as bactérias da ação do sistema complemento e de anticorpos específicos [10, 52, 53]. Os bovinos jovens, em estado de pré-puberdade, são mais resistentes à infecção [52].

Caso a bactéria permaneça disseminada na corrente sanguínea e linfática, estas se difundem para os tecidos do hospedeiro, colonizando, na sua maioria, órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. As localizações preferenciais para multiplicação são os linfonodos (principalmente os supra mamários), baço, fígado, útero, aparelho reprodutor masculino e úbere, onde podem acarretar alterações

inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos, que levam a esplenomegalia e, às vezes, hiperplasia linfóide. Além disso, podem, de forma mais rara, instalar-se nas articulações, originando higromas (lesões inflamatórias) e artrite [42].

Caso a vaca não esteja prenhe, a bactéria geralmente coloniza somente linfonodos e glândulas mamárias [52, 56, 57]. Já quando ocorre prenhez, as bactérias se deslocam para o útero por tropismo, provocando as reações fisiopatológicas que causam o aborto [55]. O tropismo acontece principalmente através da molécula eritritol, um álcool polihídrico de quatro carbonos precursor hormonal presentes em alta concentração no útero de vacas prenhas, tecidos mamários, ósteos articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino [58].

A partir do quinto mês de gestação, a concentração deste precursor hormonal aumenta, atingindo concentração máxima próximo ao parto. O forte tropismo causado pelo eritrol estimula a multiplicação bacteriana, sendo que a infecção deixa de ser latente e torna-se ativa no trimestre final da gestação. Neste período, o tecido córion-alantoideano está bem desenvolvido e existe alta disponibilidade de metabólitos no local [42, 58], facilitando esta alta taxa de multiplicação e intensa liberação de endotoxinas após lise bacteriana. Essas toxinas geram lesões na placenta e no tecido córion-alantoideano, promovendo processo inflamatório dos tecidos, placentite necrótica dos cotilédones e deslocamento placentário pela lise das suas vilosidades [58, 59].

Essas lesões inflamatórias comprometem a circulação materno-fetal, prejudicando a respiração e alimentação do feto, podendo levá-lo à morte. Nos casos

agudos da doença, quanto maior a necrose, maior a chance de ocorrer abortamento, único sintoma aparente na maioria das infecções brucélicas [16].

Após o primeiro aborto, a vaca desenvolve imunidade celular, diminuindo o tamanho e número das lesões de placentomas nas próximas gestações. [51, 61]. Com isso, o aborto torna-se menos frequente e a doença passa a se manifestar com outros sintomas, como retenção de placenta, natimortalidade ou nascimento de bezerros fracos [51, 56, 60].

3.1.10. Sinais Clínicos e Lesões na Brucelose

Nos bovinos e bubalinos, a principal forma de manifestação é o aborto, (Figura 04), principalmente no último trimestre de gestação, causando retenção de placenta, metrite e, ocasionalmente, esterilidade permanente [10, 62]. O aborto quase sempre acontece na primeira gestação, pois nas gestações subsequentes, o sistema imune celular já está desenvolvido, tornando a infecção pouco frequente [10, 62]. O feto pode ser abortado 24 a 72 horas depois de sua morte, sendo comum sua autólise [10]. Normalmente, não é observada nenhuma lesão patogénomônica da brucelose no feto abortado, porém, com frequência, observa-se broncopneumonia supurativa [10, 49].

Nos machos, pode ocorrer uma fase inflamatória aguda, seguida de frequente cronicidade assintomática. As bactérias podem tornar-se latentes em testículos, epidídimos e vesículas seminais. Um possível sinal é a orquite uni ou bilateral (Figura 05), transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume dos testículos. Em casos mais incomuns, o testículo pode apresentar-se com aspecto amolecido e purulento. Lesões articulares também podem ser observadas [49].

Figura 04: Aborto no Último Trimestre da Gestação



Fonte: Associação Brasileira de Limousin. Disponível em: www.limousin.com.br. Acessado em: 03/11/12.

Figura 05: Orquite Unilateral em Machos Brucélicos em Idade Reprodutiva



Fonte: Toledo, 2006.

A brucelose bovina, além de acarretar em problema sanitário e ocasionar grandes perdas econômicas, também é um preocupante problema de saúde pública, visto ser uma doença crônica que causa redução da produtividade laboral e invalidez. Seus principais sintomas são a anorexia, redução da força muscular, dor abdominal e testicular, calafrios, cefaleias, alteração no sono, humor depressivo e artralgias. Dentre os principais sinais, cita-se perda de peso, febre, tosse, sudorese, sinais neurológicos focais, adenopatias e hepato/esplenomegalia [48].

3.1.11. Perdas Econômicas Relacionadas a Brucelose

As principais perdas econômicas relacionadas a brucelose são causadas principalmente pelos abortamentos e os períodos de esterilidade temporária, responsáveis pela diminuição da produção de leite e a reprodutibilidade dos rebanhos [4].

A nível mundial, a principal perda econômica está relacionada as exportações de carne e leite a outros países. Esta perda está diretamente relacionada a enfermidade, pois a infecção causa interferência com programas de cruzamento, abortos de 20 a 30%, sacrifício de vacas de alto valor econômico, morte de bezerros de 20 a 25%, perda de 20 a 25% na produção leiteira, perda de vacas devido a metrite, infertilidade temporária ou permanente de 10 a 20% [5].

No Brasil, segundo dados do MAPA, os prejuízos econômicos causadas em 1971 pela infecção foram estimados em US\$ 32 milhões, considerando somente os abortos e a queda na produção leiteira [49, 63, 64].

Além dos prejuízos causados pelo abortamento, baixa produção leiteira, aumento do intervalo entre partos e baixos índices reprodutivos, as propriedades com a presença descontrolada da bactéria têm valor comercial de seus animais depreciado. [10, 16, 49].

A Organização Internacional de Epizootias (OIE) classifica a brucelose como doença da lista B, junto com outras enfermidades, como a tuberculose, que têm importância social, econômica e para saúde pública, bem como consequências no valor do mercado externo destes animais e de seus derivados [65]. Analisando as perdas indiretas, a mais preocupante é a infecção humana. Quando a enfermidade não é

tratada na fase aguda, o curso crônico da doença causa prejuízo na atividade funcional, como diminuição do tempo de trabalho, ausência do trabalho e custos do diagnóstico e tratamento [10].

3.1.12. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)

A brucelose bovina/bubalina e a tuberculose (infecção causada pela *Mycobacterium bovis*) são zoonoses endêmicas disseminadas por todo o território nacional. Devido a distribuição universal e alta incidência e prevalência, em 2001, o MAPA criou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que tem como principal objetivo a erradicação dessas zoonoses no território nacional, o aumento da competitividade da pecuária nacional e a diminuição do número de infecções, tanto para a saúde humana como animal. Como objetivos secundários, o programa visa certificar um número significativo de propriedades, a fim de oferecer ao consumidor produtos de baixo risco sanitário [10].

Como estratégias, o PNCEBT iniciou a vacinação obrigatória, emitindo, como forma de certificação internacional, relatórios favoráveis às propriedades livres ou monitoradas, bem como o controle do trânsito de animais destinados à reprodução. Já para tuberculose, por ainda não existir uma vacina, estabeleceu-se a comunicação voluntária do criador que, para obter o certificado, deve submeter a criação aos testes de tuberculinização intradérmica, a partir de animais com seis semanas de vida, sendo os animais positivos sacrificados. [10].

3.1.13. Controle e Profilaxia da Brucelose Bovina

O controle da brucelose bovina no Brasil é realizado segundo preconizado pelo PNCEBT, sendo: vacinação, certificação de propriedades livres da doença, certificação de propriedades monitoradas, controle do trânsito de animais e habilitação e capacitação continuada de médicos veterinários [10].

3.1.13.1. Vacinação (Vacina B19)

A vacinação em bovinos é compulsória desde 2003 e é preconizada uma dose única em bezerras entre 3-8 meses [62]. Atualmente, a vacina utilizada é B19, produzida principalmente pelas indústrias Vallée e Merial. Esta vacina é composta pela cepa viva atenuada 19 de *B. abortus*, que, segundo dados da literatura, induz uma resposta imunológica e proteção durante o tempo de vida útil em 65%-80% dos animais [13, 36].

A resposta sorológica após a vacinação com B19 acontece após a primeira semana, produzindo, primeiramente, o anticorpo de isotipo IgM e, em seguida, o IgG1. As imunoglobulinas IgG2 e IgA aparecerem tardiamente e aumentam, por gradiente, a pesar de permanecem em níveis baixos [10].

Apesar da vacina B19 ser eficaz para diminuir drasticamente o número de abortos e aumentar a resistência à infecção, a vacinação pode causar resultados falso-positivo em provas sorológicas de diagnóstico, afetando a interpretação do resultado do teste [66, 67]. A resposta positiva em testes sorológicos tende a desaparecer rapidamente em vacas jovens, não sendo problemático para o diagnóstico da doença

na sua fase adulta. Entretanto, para animais vacinados na fase adulta, o resultado falso-positivo torna-se preocupante. Por isso, para criações com alta frequência de abortos, recomenda-se a realização da vacinação com doses inferiores. Segundo Costa, doses 20 a 400 vezes menores das aplicadas em vacas jovens já é suficiente para conferir imunidade em fêmeas adultas [62].

Além disso, a vacina B19 também pode ocasionar orquite e epididimite em machos, aborto em fêmeas prenhas vacinadas em final de gestação e causar infecção no homem [10, 46, 98].

A vacina B19 não confere imunidade total, visto que ainda são possíveis os abortos e a excreção de bactérias. Portanto, para erradicar a mesma, deve ser realizada a associação da vacinação e eliminação dos animais infectados [10].

O tratamento para a brucelose animal não é recomendado, pois é ineficaz, devido à presença intracelular da bactéria, que impede que os antibióticos de atinjam seus alvos em concentrações ótimas para eliminá-los [26].

3.1.14. Diagnóstico para Brucelose Bovina

O diagnóstico da doença pode ser realizado de duas maneiras: por exames diretos ou indiretos. O exame direto é um método rápido de diagnóstico e consiste na identificação imunohistoquímica da bactéria em secreções ou do material do aborto, como conteúdo estomacal do feto, a placenta ou o feto em si ou por detecção de DNA, especialmente pela reação da polimerase em cadeia (PCR) [10]. Porém, a coleta do material para análise apresenta um alto risco de contaminação do manipulador da amostra durante o processamento e poucos laboratórios realizam o exame [10, 48].

O método indireto de diagnóstico mostra a presença de anticorpos contra a *Brucella sp* em diferentes materiais coletados, como fluidos corporais, soro sanguíneo, sêmen, muco vaginal e leite [10, 34, 48]. Apesar de ser amplamente utilizado e apresentar resultados sensíveis, pode acontecer reações falso-positivas devido à possível presença de anticorpos não específicos oriundo de infecções por micro-organismos como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella sp*, *Escherichia coli* O:157 ou *Pseudomonas sp*. Além disso, a vacinação com B19 em idade adulta também pode gerar falso-positivo devido a presença de anticorpos contra a bactéria atenuada da vacina [10, 34].

A melhor estratégia é a combinação de testes. Preconiza-se a realização de um teste de triagem barato, sensível e de fácil execução, seguido de um teste confirmatório, somente para material positivo no teste anterior. O teste confirmatório tem maior especificidade que o teste de triagem, além de apresentar boa sensibilidade [10]. Os testes sorológicos são normalmente classificados segundo o antígeno utilizado na reação, como mostrado na Tabela 09.

Tabela 09: Diagnóstico Sorológico em Função do Estado Evolutivo da Brucelose Bovina

Teste	Brucelose Aguda	Brucelose Localizada	Brucelose Crônica
Hemocultura/Mielocultura	+++	±	±
Teste de Soroaglutinação em Tubos ou Teste de Wrogh e de Huddleson	+++ (na primeira e segunda semana)	±	-
Teste de Soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado	+ (na segunda semana)	+	±
Teste de 2-mercaptoetanol	+ (na segunda semana)	++	±
Fixação do Complemento	++ (na terceira e quarta semana)	++	±
Imunofluorescência indireta	++ (na segunda e terceira semana)	++	+
ELISA	+ (na primeira e segunda semana)	+	+

Fonte: Pessegueiro, P.; Barata, C.; Correia, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. 2003.

3.1.15. Resposta Imune contra a Brucelose

Como a *Brucella* é uma parasita intracelular facultativo, esta pode se reproduzir e sobreviver dentro de macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos protegidas do sistema imune. Portanto, a ação do organismo hospedeiro para o combate da enfermidade torna-se mais difícil [10, 68].

Apesar de todos os mecanismos de defesa (inata e adaptativa) serem prontamente ativados durante a infecção, devido ao ciclo intracelular da bactéria, a imunidade mais eficaz é a adaptativa mediada por células [10, 68].

3.1.15.1. Resposta Imune Inata

A imunidade natural acontece no estágio inicial da infecção, visando diminuir a concentração bacteriana do organismo. Por isso, a resposta Th1 acontece, predominantemente, por macrófagos, neutrófilos, natural killer (NK) e complemento [10, 68, 69, 70].

Após a penetração da bactéria no organismo hospedeiro, um dos primeiros e principais sistemas atuantes é o complemento que é ativado pela via alternativa ou via anticorpo-independente. Neste processo, os micro-organismos, por possuírem componentes específicos, são capazes de produzir a ativação de seus componentes iniciais (C3) deste sistema, levando a opsonização das bactérias [68, 79]. Apesar de ocorrer ativação do complemento primeiramente pela via alternativa, esta não é capaz de eliminar a *Brucella abortus* 2308 [68, 80]. A lise bacteriana está mediada principalmente pela via clássica dependente de anticorpos [68, 78].

Os macrófagos, como células alvo da bactéria, desempenham papel fundamental frente à infecção, pois atuam como eficazes células fagocitárias e apresentadoras de antígenos [68]. Como células fagocitárias, diminuem a concentração bacteriana na circulação sanguínea, pois são pouco exigentes e tem alta atividade contra bactérias intracelulares. No interior do vacúolo fagocítico, a morte da *Brucella* acontece por diferentes mecanismos de destruição, como queda do pH, reação com espécies

reativas de oxigênio e nitrogênio, lipases e lisozimas [68, 69, 71]. Já como apresentadoras de antígenos, são eficazes na apresentação de epítopos, pelo complexo maior de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II), a linfócitos e outras células de defesa, iniciando assim a resposta imunológica adaptativa. O principal antígeno na ativação do sistema imunológico é o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana celular da *Brucella* e abundantemente apresentado pelo MHC-II [68, 72, 73].

Os neutrófilos, assim como os macrófagos, são excelentes células fagocitárias e participam no processo inicial da doença, atuando na diminuição da concentração bacteriana do organismo, através da fagocitose e destruição ativa do patógeno [68, 74, 75]. Estes chegam ao local de infecção pela quimiotaxia de substâncias liberadas pelas células de defesa e o próprio micro-organismo [68, 74, 75]. A destruição bacteriana acontece principalmente por espécies reativas de oxigênio e por processos independentes de oxigênio, como a desgranulação (liberação de enzimas como mieloperoxidase, catepsina e azurocidina) e a fusão do lisossoma com o fagossoma que contém a bactéria (liberando hidrolase ácida, glicosilases, proteases e lipases) [68, 76]. A bactéria *Brucella* pode sobreviver aos mecanismos de ataque das células fagocitárias através da produção de moléculas de baixo peso molecular que inibem enzimas e espécies reativas de oxigênio, garantindo a sobrevivência e disseminação da bactéria [68, 77].

As células NK tem sua atividade lítica ativada pelas bactérias e estimulam a secreção de interferon gama (INF-gama) e produção de interleucina 12 (IL-12) das células apresentadoras de antígeno [68, 70, 78].

3.1.15.2. Resposta Imune Adaptativa

A imunidade adaptativa é o mecanismo de defesa mais efetivo contra a *Brucella*, principalmente pelo fato das bactérias, por muitas vezes, resistirem à fagocitose promovida pelas APC, permanecendo no interior desta de forma crônica [68, 81]. A defesa adaptativa tem início devido a uma exposição prolongada do animal ao micro-organismo e está diretamente relacionada com as citocinas [68]. A exposição crônica muda a natureza da resposta de celular para humoral, ou seja, da defesa fagocitária inata para a imunidade mediada por anticorpos, principalmente IgM e IgG1, e células citotóxicas [10, 68].

A imunidade adaptativa tem início principalmente devido as mudanças imunológicas causadas pela cronicidade, como diminuição dos linfócitos T auxiliares (CD4+), baixa produção de INF-gama e liberação de IL-12, citocina responsável por aumentar a diferenciação de células Th0 em Th1 e 2 [68, 82]. A resposta humoral baseia-se em três principais mecanismos de defesa: produção de INF-gama por linfócitos CD4+ e CD8+, que ativa a função bactericida das células fagocitárias; a citotoxicidade de linfócitos CD8+ e a produção de isótopos de anticorpos, como IgG2a, que opsonizam o patógeno, facilitando sua eliminação [68, 69].

Os anticorpos produzidos por animais infectados com *Brucella* agem contra diversos componentes da bactéria e estão diretamente relacionados com a eliminação do patógeno [68, 84]. Considera-se que os anticorpos bloqueadores, principalmente os específicos para o antígeno O presente no LPS e algumas porinas, são os mais efetivos

para tal propósito, impedindo que grande quantidade de *Brucella* seja liberada para o meio extracelular [68, 85].

A ativação dos macrófagos na imunidade inata faz com que células T imaturas (Th0) se diferenciem em células efetoras e de memória, que secretam diferentes tipos de citocinas no organismo [68, 86]. Os linfócitos Th1 secretam principalmente a IL-2 e o INF-gama, sendo que ambos são importantes para produção de células Th1 de memória [68, 87]. O INF-gama é responsável por ativar a função lítica contra *Brucella* dos macrófagos e linfócitos T citotóxicos, inibir a ação de IL-4 nas células T e estimular maior secreção de IL-2. Já o IL-2 é responsável por atrair células inflamatórias efetoras, como neutrófilos e linfócitos, que, através de mecanismos definidos, agem no combate à infecção brucélica [68, 69, 87, 88, 89].

Os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 [90]. As citocinas IL-4 e IL-10 têm como principal função inibir a ação dos macrófagos e tem suas ações diminuídas durante a resposta adquirida. A IL-5, por outro lado, é responsável por ativar células B e eosinófilos, bem como induzir produção e secreção de imunoglobulinas, responsáveis pela resposta imune humoral da infecção [68, 90].

Já as células citotóxicas T CD8⁺ são células efetoras que atuam na eliminação de macrófagos infectados diretamente com a *Brucella* (mecanismo de apresentação MHC-I), sendo as perforinas e granzimas seus principais métodos de citotoxicidade [68, 86, 89, 91].

As células B são diretamente estimuladas pelos linfócitos T, através da interação de moléculas co-estimuladoras, como CD40-CD40L [68, 86]. Esta interação, assim

como citocinas IL-5, promove produção e secreção de anticorpos IgG contra a infecção por *Brucella*, substituindo o IgM que estava previamente no organismo durante o início da infecção [68, 86].

Os anticorpos IgG e IgM são importantes mecanismos de defesa contra a infecção, pois, em baixa concentração, são capazes de promover a lise bacteriana, através da via clássica do complemento [68, 85]. Segundo Ko e Splitter (2003), a combinação da opsonização e o aumento de morte intracelular da bactéria é o principal mecanismo imunológico no combate à doença [68, 69]. Além da lise celular, paradoxalmente, a alta concentração de IgG durante a infecção aguda previne a lise extracelular da bactéria mediada por complemento, aumentando a localização intracelular desta (cronicidade) e, conseqüentemente, a extensão da enfermidade [68, 69]. O principal antígeno reconhecido e combatido pelas imunoglobulinas formadas é o LPS da *Brucella sp* que, além de imunogênica, é o principal epítipo detectado em exames sorológicos de diagnóstico. A maioria dos anticorpos presentes no soro de bovinos e bubalinos é do isotipo G (IgG1 e IgG2), seguidas das classes M (IgM) e A (IgA) [10].

3.1.15.3. Citocinas

As citocinas desempenham papel fundamental no controle da brucelose bovina e dirige a resposta imunológica celular e humoral [68]. A Tabela 10 apresenta um resumo das principais moléculas atuantes na infecção contra brucelose, assim como sua principal função.

Tabela 10: Principais Citocinas Atuantes na Infecção por *Brucella*

Citocina	Principal função
IL-12	Desempenha papel fundamental na diferenciação de Th0 em Th1 e Th2.
INF- γ	Ativa a função bactericida dos macrófagos e linfócitos T, inibe a ação de IL-4 nas células T e estimula produção de células Th1 de memória E secreção de IL-2.
IL-18	Estimula a produção de INF- γ e atua sinergicamente com IL-12 para início da resposta adquirida.
TNF- α	Contribui para a resistência por uma via independente de INF- γ , estimula influxo de fagócitos para o sítio de infecção e participa da ativação dos macrófagos.
IL-10	Inibe resposta Th1 (aumenta a susceptibilidade à infecção com <i>Brucella</i>), pois: diminui a capacidade de apresentar antígenos dos macrófagos e inibe secreção de INF- γ .
IL-2	Estimula produção de células Th1 de memória e atrai células inflamatórias efetoras para o sítio de infecção.
IL-4	Inibe ação de macrófagos.
IL-5	Ativa células B e eosinófilos e estimula produção de imunoglobulinas.

Fonte: Rivers et al (2006).

Apesar de IL-12 desempenhar papel fundamental na diferenciação de Th0 em Th1 e Th2 [68, 69, 91, 95], estima-se que a *Brucella* não é um forte indutor dessa citocina [68, 96]. Já INF- γ participa efetivamente dos mecanismos defensivos e é considerado um fator chave para o desenvolvimento da proteção contra a infecção [68].

3.1.16. Antígenos da *Brucella sp*

De um ponto de vista imunológico, os antígenos da bactéria *Brucella* podem ser divididos em dois grandes grupos: as proteínas e o LPS [68, 97].

3.1.16.1. Lipopolissacarídeos (LPS)

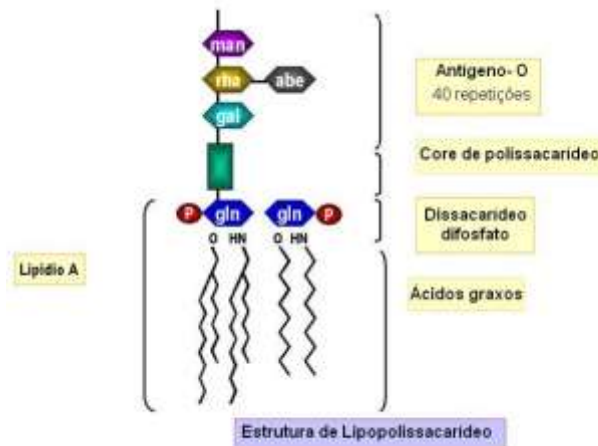
O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas e tem um papel fundamental na ativação da resposta imunológica. Seus efeitos imunológicos são mediados principalmente pelo fator de transcrição nuclear kappa b (*nuclear factor kappa B* ou NFkB), que se mantém inativo no citoplasma e que migra para o núcleo após a interação do LPS com seus receptores, promovendo a transcrição de diversos genes relacionados à resposta inflamatória aguda [68, 99].

A bactéria *Brucella* pode ser dividida antigenicamente em células lisas ou rugosas [68, 100]. Os LPS das células lisas possuem o polissacarídeo O, antígeno que apresenta importante papel na sobrevivência intracelular, como mostrado na Figura 06 [68, 101]. Já o LPS das bactérias rugosas contém pouco ou nenhum polissacarídeo O, tornando escassa sua resposta imunológica por este epítipo [68, 101].

Apesar de cepas rugosas, em teoria, não serem patogênicas para seus hospedeiros, as espécies *Brucella ovis* e *B. canis* são rugosas e causam enfermidade. Apesar da falta de estudo e definição genética, propõe-se que este fato deve-se a capacidade aumentada da sobrevivência destes micro-organismos nos macrófagos, estimulando resposta imunológica celular do hospedeiro [68, 102].

A importância imunológica do antígeno O é sua influência direta na alta produção de anticorpos específicos durante resposta humoral, sendo IgG2 e IgG3 os principais isótipos [68].

Figura 06: LPS da Cepa Lisa de *Brucella abortus*



Fonte: Microbiologia e Imunologia Online. Disponível em:
http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter_4_bp.htm. Acessado em: 30/12/12.

A cadeia O dos lipopolissacarídeo é a estrutura mais exposta da membrana da bactéria e, consequentemente, a mais antigênica. Esta é formada por um polímero de cerca de 100 resíduos de 4-formamido-4,6-didesoxiaminosa [68, 101, 103, 105] e é o componente imunodominante das cepas lisas de *B. abortus*, induzindo alta produção de anticorpos específicos em animais infectados [68, 106].

Experimentos mostram que a exposição do antígeno O ao sistema imunológico de camundongos infectados induz alta produção dos anticorpos do isotipo IgG2a e IgG3, além de baixa produção de IgM [68, 106]. Vale ressaltar que esses anticorpos,

principalmente do tipo IgG, são fatores importantes para desencadear a resposta imunológica celular e humoral [68, 107].

Além do antígeno O, o LPS possui outras moléculas importantes na resposta imunológica, como o lipídeo A e as moléculas de manose, observadas na Figura 06 [68]. A interação com receptores CD14 de células fagocitárias, passo inicial para a fagocitose, acontece pelo lipídeo A presente em sua estrutura. Esta interação estimula a produção de TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-8, mediadores dos sintomas de choque séptico [68, 108]. Já as moléculas de manose presentes no terminal externo do antígeno O de cepas lisas de *B. abortus* favorecem a ligação e aderência às células fagocitárias do hospedeiro, já que estas células imunológicas possuem receptores específicos para a estrutura do antígeno O, facilitando o desencadeamento da resposta imunológica [68, 109].

Apesar do LPS ser uma estrutura comumente encontrada em diferentes espécies de bactérias enteropatogênicas, o lipopolissacarídeo da *Brucella* se diferencia dos demais por não estar estabilizado por ligações catiônicas divalentes, conter maior carga negativa e menor quantidade de ácido 2-ceto-3-deoxioctanóico. Essas diferenças diminuem a ação de peptídeos catiônicos bactericidas encontrados nas superfícies das mucosas, dentro dos grânulos fagocíticos, e na superfície do corpo, como as defensinas, protegrinas e tioninas [68, 110]. Além disso, o LPS de *Brucella* tem baixa toxicidade para os macrófagos, baixa pirogenicidade, baixa atividade ferropênica e é um fraco indutor do INF-gama e do Fator de Necrose Tumoral (TNF) [68]. Apesar de ser um fraco indutor do INF-gama e do TNF é um forte indutor da IL-12 e dos linfócitos Th1 [48, 68, 90, 111].

3.1.16.2. Proteínas

Dentre as proteínas que possuem papel antigênico na infecção da *Brucella* e são reconhecidos no sistema imunológico, as principais são as da membrana externa, as localizadas no citoplasma e as de choque térmico [68, 112].

3.1.16.2.1. Proteínas de Membrana Externa

As proteínas de membrana externa são as mais importantes na ativação do sistema imunológico durante a infecção e podem ser classificadas em três diferentes grupos [68, 112].

As do Grupo I são aquelas relacionadas com a biossíntese do envoltório celular e possuem um peso molecular entre 88 e 94kDa [68, 113, 114, 115, 116, 117]. As do Grupo II são equivalentes às porinas de bactérias enteropatogênicas gram-negativas e produzem resposta imune significativa quando associadas com outras proteínas, como a proteína ribossomal L7/L12. Dentre estas, pode-se citar Omp 2, Omp16, OmpC, OmpF, etc, sendo que o peso molecular varia entre 28 e 40kDa [68, 113, 114, 115, 116, 117, 179, 180]. Por fim, as proteínas do Grupo III interagem fortemente com o LPS e possuem peso molecular entre 25 e 30kDa [68, 113, 114, 115, 116, 117].

3.1.16.2.2. Proteínas Citoplasmáticas e Ribossomais

As proteínas citoplasmáticas vêm se destacando no estudo da produção de vacinas utilizando metodologia biotecnológica, sendo as enzimas catalase e a superóxido dismutase Cu/Zn (SOD) as mais amplamente estudadas [68, 118, 119].

As proteínas citoplasmáticas permitem que a bactéria permaneça por mais tempo no interior das células fagocitárias, pois são, em sua maioria, enzimas protetoras dos mecanismos oxidativos das células apresentadoras de antígenos [68].

3.1.16.2.2.1. Proteína Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD pertence à família das metaloproteínas e pode ser classificada em SOD Cobre/Zinco, SOD Manganês e SOD Ferro, dependendo dos metais encontrados no sítio ativo [68].

Dentre seus subtipos, a mais importante imunologicamente é a SOD Cu/Zn. Esta enzima faz parte do sistema de defesa antioxidante da bactéria, protegendo-a dos efeitos tóxicos provocados pelas espécies reativas de oxigênio de células fagocitárias através da transformação dos radicais superóxidos (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio gasoso (O_2) [68, 69]. Essa transformação contribui para a sobrevivência intracelular da *Brucella* e permite maior prevalência desta no organismo [68, 69].

3.1.16.2.2.2. Catalase

A catalase é uma enzima auxiliar da SOD Zn/Cu, pois ajuda na desintoxicação do ambiente bacteriano, atuando sobre peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) gerados no interior do macrófago após a fagocitose da *Brucella* [68, 69]. Essa enzima transforma os peróxidos em água e oxigênio gasoso e é importante para a permanência da bactéria no interior das células do hospedeiro [68, 108].

3.1.16.2.2.3. Lumazina Sintetase

Algumas bactérias, como a *Brucella spp*, são capazes de sintetizar riboflavina, pois não conseguem captar esta vitamina externamente [120].

A vitamina B2 é essencial para biossíntese e crescimento da bactérias, e organismos capazes de sintetizar a riboflavina utilizam o trifosfato de guanosina (GTP) como molécula precursora. O GTP, pela catálise da riboflavina sintetase, forma a pirimidinadiona, que é, em seguida, convertida a lumazina pela enzima lumazina sintetase [120].

Como as enzimas riboflavina e lumazina sintetase são reutilizadas na reação de produção desta vitamina, a inibição destas causaria ausência de B2 no micro-organismo, levando a sua morte [12, 120].

A lumazina sintetase é uma proteína citoplasmática pentamérica de 18 kDa que induz forte resposta Th1, quando injetada na sua forma livre, sendo uma das principais proteínas imunodominantes na produção de vacinas recombinantes [182].

3.1.16.2.2.4. Proteína Ribossomal L7/L12

A proteína L7/L12 é uma proteína ribossomal essencial para a função do ribossomo bacteriano [11, 68]. Esta proteína tem demonstrado conferir imunidade celular eficiente frente à infecção por *B. abortus* e é a principal aposta para produção de vacinas utilizando abordagem biotecnológica [68, 122].

3.1.16.3. Proteínas de Choque Térmico

O papel desempenhado pelas proteínas de choque térmico na infecção pela *Brucella* ainda é incerto. Observou-se que as bactérias intracelulares expressam níveis significativos destas proteínas [68, 69, 88, 123].

Dentre as principais proteínas, destacam-se as GroEL (60 kDa) e GroES (10 kDa), chaperonas relacionadas com a estruturação (*folding*) correto de proteínas; a HtrA (60 kDa, *High temperature requirement A stress response protein*) é uma protease que degrada proteínas que causam danos oxidativos [68, 88, 124] e a enzima UvrA repara as lesões do DNA após o dano oxidativo [68, 81].

3.1.17. Genética da *Brucella*

O DNA da *Brucella* é menor que o da *Escherichia coli* ($4,7 \times 10^6$ pares de bases) e possui aproximadamente $2,5 \cdot 10^6$ pares de base [68]. Dentre estes, a maioria, cerca de 58 a 59%, são guaninas e citosinas, que, segundo a regra de Chargaff, ligam-se entre si por tripla ligação de hidrogênio [68, 125].

Apesarem de pertencerem ao mesmo gênero, as espécies de *Brucella* se diferenciam entre si pelo número de cromossomos. Estudos revelam que espécies isoladas de *B. suis* apresentam apenas um cromossomo, enquanto outras espécies possuem dois circulares de aproximadamente $2,1 \cdot 10^6$ e $1,15 \cdot 10^6$ pares de base [68, 126, 127, 129].

Uma característica presente em todas as espécies de *Brucella* é a ausência de plasmídeos e fagos temperados, que permite adaptação estável a diferentes nichos

ecológicos, como o ambiente intracelular, e elimina a possibilidade de transferência do material genético na natureza [68, 128, 129].

As espécies do gênero *Brucella*, apesar de possuírem hospedeiros específicos, exibem cerca de 95% de homologia em seu genoma. Estudos propõe que as espécies atualmente encontradas são cepas da *B. melitensis*, apesar de outros mostrarem polimorfismo em determinadas sequências que coincidem espécies clássicas e biovars [68, 129, 130, 131, 132].

Estima-se que 8% do genoma destinam-se às funções regulatórias da virulência e sobrevivência. Este valor é alto quando comparado a outras bactérias patogênicas, como a *Salmonella sp*, que utiliza somente de 3-4% [68, 104].

3.1.18. Vacinas contra *Brucella abortus*

As vacinas atualmente comercializadas utilizam cepas bacterianas atenuadas como principal mecanismo de ação. Porém, estudos recentes indicam a tendência da utilização de antígenos próprios da *Brucella* para a produção de vacinas, principalmente pela utilização de metodologia biotecnológica.

A vacina recomendada pelo PNCEBT é a Brucelina B19, fabricada principalmente pelas indústrias Vallée e Merial. Atualmente, existem outras vacinas no mercado, que utilizam antígenos específicos para induzir resposta imunológica, em especial a Th1 [10].

3.1.18.1. Vacinas de Bactérias Vivas Atenuadas

3.1.18.1.1. *Brucella abortus* B19

Conhecida como B19, a vacina mais comercializada no Brasil e no mundo é formada pela cepa lisa 19 da *B. abortus* atenuada [10, 106]. Apesar do mecanismo genético que promove a atenuação da bactéria não ser completamente elucidado, sabe-se que, no processo, ocorre a perda do mecanismo essencial de virulência [134]. Portanto, a vacina B19 produzida com amostras vivas atenuadas tem intensa capacidade de ativar a resposta imunológica do hospedeiro, sem provocar a infecção [10].

A efetividade e o grau de proteção da vacinação depende de diversos fatores, como a idade da fêmea, dose da vacina, forma de aplicação, prevalência da brucelose no rebanho vacinado, entre outros, porém, se utilizada [135] de forma convencional, protege de 60% a 75% contra o abortamento [10].

A vacina vem na forma liofilizada e contém cerca de 60 bilhões de células [17]. No Brasil, a vacinação é obrigatória para bezerras entre três e oito meses de idade, porém, algumas raças de bovinos leiteiros amadurecem mais cedo, e, por isso, devem ser vacinados entre três a seis meses, para diminuir a interferência dos anticorpos no sorodiagnóstico [10, 18].

As falhas de vacinação estão relacionadas principalmente com o mau treinamento do manipulador no momento da aplicação. Dentre os principais erros, pode-se citar contaminação do manipulador, erro na dose, erro na forma ou via de administração, mau armazenamento do produto, idade do bezerro no momento da

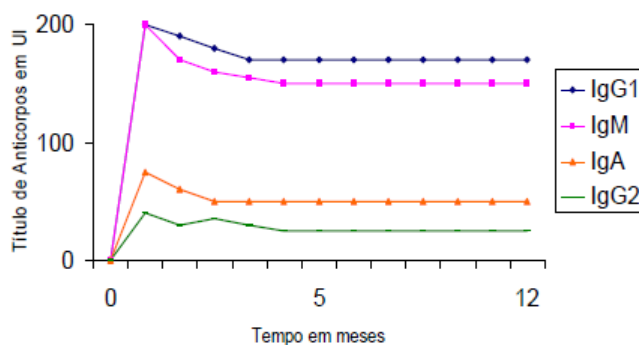
aplicação, ineficácia da vacina e possíveis reações locais, e dificilmente estão relacionados a um aumento na virulência do micro-organismo [15].

Segundo fabricante, fêmeas vacinadas com B19 até os 08 meses de vida estão protegidas por um período de até sete anos após a vacinação [10, 16]. A resposta humoral de bovinos vacinados com B19 acontece pela síntese de quatro principais isotipos imunoglobulinas e pode ser analisado nas Figuras 08, 09 e 10 [10].

Quando o animal é vacinado fora da idade adequada ou é infectado com a cepa silvestre de *B. abortus*, ocorre, produção intensa de IgG1 e IgM e mediana de IgA e IgG2. Esses títulos permanecem elevados meses após exposição primária (Figura 07), podendo interferir no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade [10, 106]. Já quando o animal é vacinado em idade adequada, ou seja, até oito meses, apesar de ocorrer intensa produção de anticorpos após a vacinação (Figura 08), os títulos não permanecem elevados por muito tempo (Figura 09), tornando o animal negativo para testes sorológicos na idade adulta [10].

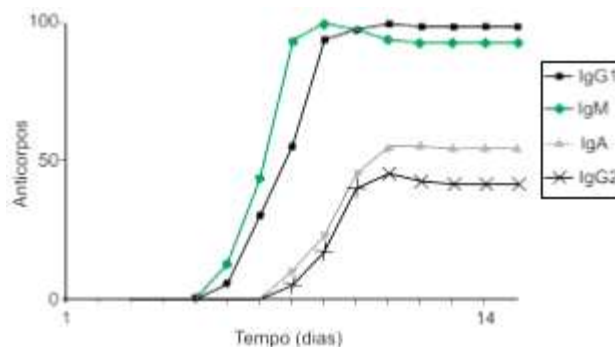
Figura 07: Resposta Imunológica Humoral de Animais Infectados com Cepa

Silvestre de *Brucella abortus*



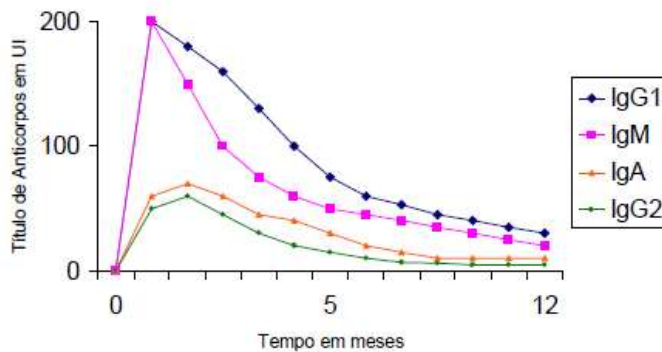
Fonte: Adaptada de Brasil, 2006.

Figura 08: Resposta Imunológica Humoral de Bovinos Vacinados com B19



Fonte: Adaptada de Brasil, 2006.

Figura 09: Resposta Imunológica Humoral a Longo Prazo de Bovinos Vacinados com a Vacina B19



Fonte: Adaptada de Brasil, 2006.

A vacina B19, como citado anteriormente, é responsável pela diminuição da taxa de infecção em zonas de alta prevalência e quando a imunização é realizada em determinada região, ocorre redução gradativa da prevalência e incidência da brucelose [10]. Dados indicam que quando a vacinação atinge 80% do rebanho, a prevalência da doença fica a níveis inferiores a 2% [10, 17].

Como os principais efeitos adversos são a orquite uni ou bilateral em machos e abortamento, principalmente no seu terço final (entre 1% e 2,5%), em fêmeas [10, 19, 95, 136, 137], não se recomenda a vacinação de machos ou fêmeas gestantes [10].

Dentre as vantagens, pode-se citar o fato da vacina possuir cepa estável e que não se multiplica em presença de eritritol e o pouca ou ausente reações locais e sistêmicas após sua inoculação [14].

Já dentre suas principais desvantagens, destaca-se que sua efetividade variável, a presença da cadeia O do LPS de membrana, indução do aborto em vacas prenhas e ser possivelmente patogênica para humanos [10, 19, 95, 136, 137].

3.1.18.1.2. Brucelina RB51

A vacina Brucelina RB51 é formada pela cepa mutante rifampicina-resistente originada de *B. abortus* 2308 biovar 1 e atenuada de *B. abortus* RB51 [139, 140]. Ao contrário da B19, a cepa RB51 é uma cepa rugosa e não possui a cadeia O do LPS, não interferindo com o diagnóstico por testes sorológicos, levando a amostragem falso-positiva [139, 140, 142, 143, 144].

Estudos mostram que sua eficácia é semelhante à da cepa B19, atingindo até 70% de eficácia [139, 144]. Além disso, a cepa rugosa é capaz de induzir uma resposta imunológica celular e humoral contra a bactéria, sendo sua vacinação preferencial à B19 em diversos países, como os Estados Unidos, Chile, Venezuela, Paraguai, México, Uruguai, Colômbia entre outros [139, 140].

O MAPA recomenda a vacinação com a amostra RB51 em bezerras com idade superior a oito meses (e que não foram vacinadas com a amostra B19 na idade

estipulada pelo PNCEBT) e fêmeas adultas não reagentes aos testes diagnósticos somente em rebanhos os regiões com focos de brucelose. O Ministério da Agricultura também proíbe o uso desta vacina em machos, fêmeas até oito meses de idade ou prenhas [139, 140].

Apesar de apresentar a vantagem de não interferir em testes sorológicos e induzir proteção significativa contra a *Brucella*, a vacina RB51 não é muito estável, podendo reverter-se na sua forma ativa e induz inflamação local no sítio de aplicação. Além disso, por tratar-se de uma cepa atenuada, é possivelmente patogênica para o manipulador e de difícil homogeneização, por ser uma estirpe mucóide [139, 140].

A dose recomendada da RB51 é de 2 mL por via subcutânea, o equivalente a 1 a 3,4. 10^{10} células [139, 140]. As principais diferenças e semelhanças entre as vacinas B19 e RB51 estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11: Principais Diferenças Entre as Vacinas de Bactérias Atenuadas Utilizadas no Combate à Brucelose Bovina

Características	B19	RB51
Número de Doses	Dose Única	
Animal Alvo	Bovinos e Bubalinos	
Proteção	Cerca de 60% contra infecção e 70% contra aborto	
Inocuidade	- Pode provocar aborto em vacas prenhas.	
Proteção Cruzada	- Patogênica para bovinos machos e humanos.	
	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> e <i>B. ovis</i> em testes em camundongos
Restrição quanto ao Sexo	Fêmeas	Fêmeas
Restrição quanto a Faixa Etária	3 a 8 meses	Nenhuma
Apresentação	Liofilizada	Liofilizada
Aplicação	Subcutânea	Subcutânea
Interferências no Diagnóstico	Sim	Não
Desvantagens:	- Efetividade variável (dependente de diversos fatores); - Interferir no diagnóstico tradicional de bovinos infectados com cepas silvestres; - Induzir o aborto e orquite; - Ser restrita a fêmeas; - Ser possivelmente patogênica para humanos.	- Difícil homogeneização devido a estirpe ser mucóide; - Possibilidade de inversão em cepa ativa; - Induzir o aborto e orquite; - Ser restrita a fêmeas; - Ser possivelmente patogênica para humanos.
Observações	Vacina mais utilizada no Brasil.	Vacina mais utilizada nos Estados Unidos, Chile, Venezuela, Paraguai, México, Uruguai, Colômbia.
Recomendação	Uso recomendado em fêmeas com 3 a 8 meses de vida.	Uso recomendado somente quando B19 é ineficaz ou em vacas com mais de 8 meses de vida.

Fontes: Manual Técnico Brucelina Amostra RB51 – Vallée. Brasil, 2006.

3.1.18.1.3. REV1

A vacina foi originada a partir de *B. melitensis* biovar 1 e é utilizada para prevenir a brucelose caprina e ovina (*B. melitensis* e *B. ovis*) [133, 138]. Sua dose completa é de 1.10^9 células e é eficaz na indução de anticorpos IgG [138].

Apesar de *B. melitensis* ser a espécie mais patogênica [133], a infecção por *B. ovis* pode ocasionar orquite, epididimite, e, mais raramente, abortos esporádicos em ovinos e placentite infecciosa em cordeiros, resultando no nascimento de filhotes fracos [133].

As ovelhas também podem ser infectadas pela espécie *B. melitensis* devido a prática de co-criação com caprinos. Os sintomas secundários são depressão, artrite, febre, mamite, e podem passar despercebidos quando o sistema de criação é extensivo [133].

3.1.18.2. Vacinas de Bactérias Mortas

3.1.18.2.1. *Brucella abortus* 45/20

A vacina 45/20 foi originada de uma estirpe rugosa de *B. abortus* morta e teve sua comercialização interrompida no Brasil devido, principalmente, à baixa indução de anticorpos [140]. Além disso, também apresenta como desvantagens, a necessidade de repetição da aplicação, menor eficácia quando comparada com a B19, interferência transitória no diagnóstico por teste sorológico e reações locais indesejadas. Atualmente, seu uso é restrito à testes de anamnese [140, 141].

3.1.18.2.2. Vacina H 38 (Cepa Morta por Formol)

Originada a partir de uma cepa morta de *B. melitensis*, é utilizada na vacinação de caprinos, ovinos e bovinos [140]. Não é utilizada, pois causa indução de título alto em testes sorológicos, reação local na administração subcutânea e baixa proteção contra infecção [140].

3.1.18.2.3. P. B. *B. abortus* S19 (Cepa Morta por Calor)

Originada a partir de uma cepa de *B. abortus* morta por aquecimento, é utilizada na vacinação somente de bovinos [140]. Não é utilizada, pois causa indução de título alto em testes sorológicos de diagnóstico e baixa proteção contra infecção [140].

3.1.19. Novas Tendências na Geração de Vacina para Brucelose

As novas estratégias de vacinação contra a brucelose bovina são as chamadas vacinas de terceira geração e promovem imunização altamente efetiva, baseando-se em moléculas de DNA, RNA e proteínas recombinantes imunogênicas [68].

3.1.19.1. Vacinas Subcelulares

A imunização com vetores de expressão plasmidial se baseia na expressão *in vivo* de antígenos específicos que induzem resposta imunológica através de metodologia biotecnológica.

Esse tipo de vacina tem sido intensamente estudada, devido ao fato de eliminar as desvantagens presentes em vacinas de bactérias vivas atenuadas. Por trabalhar apenas com epítomos imunogênicos, não existe o risco de infecção do manipulador, não ocorre interferência no diagnóstico em testes sorológicos e as chances de orquite ou aborto ficam drasticamente diminuídas [10, 181].

Apesar de atingirem um nível de proteção adequado, as vacinas subcelulares mostram eficácia inferior as vacinas vivas atenuadas, necessitando de um maior número de aplicações [181]. Por essa razão, estudos recentes tem utilizado outras abordagens tecnológicas, como a fusão de duas proteínas imunodominantes ou o uso de mediadores de entrega [122, 162, 163, 177, 179, 181].

Existem diferentes antígenos que induzem resposta imune mediada por células, indicando serem epítomos chaves para produção deste tipo de vacinas. Esses antígenos são, na sua maioria, enzimas ou proteínas da estrutura celular bacteriana e dentre eles, destacam-se:

As lipoproteínas de 18kDa presentes na superfície de *Brucella* [68, 145] induzem resposta imunológica significativa, porém, interferem com o diagnóstico, causando resultados falso-positivos em testes sorológicos [68].

A enzima glicosiltransferase da *Brucella*, responsável pela produção do antígeno O do LPS, produz resposta significativa, principalmente quando associada com a SOD Cu/Zn [166, 167].

As proteínas periplasmática P39 e a bacterioferritina, apesar de imunogênicas, não produzem níveis significativos de proteção, ainda que se utilizem adjuvantes como o carboxiprimaquinase (Cpg) durante sua administração [68, 146].

As proteínas de choque térmico UvrA, GroEL, GroES e HtrA de *B. abortus* [68, 81] são antígenos altamente imunogênicos e estimulam resposta imune celular e humoral no organismo infectado [68, 123], apesar de não induzir o sistema imunológico suficientemente para o combate a *Brucella* [68, 88].

As proteínas lumazina sintetase e ribossomal L7/L12 produzem proteção forte e significativa, com ativação de células T CD4+, secreção de altos níveis de INF-gama e produção de IgG [68, 69 71, 81].

A proteína de 18,5 kDa SOD Cu/Zn de *B. abortus*, antígeno que melhor induz resposta imunológica protetora, produzindo resposta Th1 com secreção de INF-gama e Il-2, porém não Il-4 [68, 82, 110].

Por fim, as proteínas de membrana externa (*OMP – outer membrane protein*) do Grupo II, como Omp 16 e Omp 28, que apesar de não produzirem resposta imunológica suficiente quando administradas na sua forma livre, são eficazes na proteção de brucelose em conjunto com outras proteínas imunodominantes, como a proteína ribossomal L7/L12 [179, 180].

3.1.19.2. Vacinas de DNA

O método de vacinação com DNA se baseia no uso de um plasmídeo bacteriano que contenha um promotor viral forte capaz de expressar em células eucariontes, um

gene de um antígeno específico que induza resposta imunologia e uma sequência de término poliadenilada [68]. Neste método, não ocorre expressão e purificação da proteína, pois o plasmídeo que se replica no interior de um sistema de expressão (normalmente *E. coli*) é isolado, purificado e injetado no hospedeiro. Para garantir segurança e eficácia da vacinação, o plasmídeo é fabricado sem origem de replicação funcional em células eucariontes, impedindo replicação na célula hospedeira e integração no DNA cromossomal deste [68, 147].

Da mesma forma que as vacinas com proteínas recombinantes, as vacinas de DNA garantem biossegurança do manipulador e não interferem no diagnóstico por teste sorológico [68, 148].

Para a brucelose, os antígenos mais estudados no método de vacinação por DNA são as proteínas L7/L12 [11] e lumazina sintetase [12], pois, em testes com camundongos, induzem um alto nível de proteção contra a infecção. Já testes em camundongos BALB/c que envolvem a tradução do gene (*sodC*), que codifica a proteína SOD Cu/Zn de *B. abortus*, produz uma alta secreção de anticorpos, exibindo dominância de isotipos IgG2a sobre IgG1, resposta proliferativa de células T CD4 (resposta Th1) e CD8 citotóxicas e alta produção de interferon-gama, porém não de Il-10 ou Il-4 [68, 118, 150].

3.1.19.3. Vacinas de RNA

As vacinas de RNA, assim como as de DNA, utilizam vetores de expressão. Porém, neste caso, os vetores são baseados no vírus Semliki Forest (SFV), que são

partículas virais suicidas formadas por RNA autoreplicável que contém o gene que codifica o antígeno imunogênico.

Para a brucelose bovina, o antígeno mais estudado no método de vacinação por RNA é a proteína SOD Cu/Zn de *B. abortus* empacotada no vírus Semliki Forest, pois induz um alto nível de proteção contra a infecção quando testado em camundongos [68, 119].

3.2. Proposição de um Processo Biotecnológico para a Produção de Antígenos Purificados Usados em Vacina Contra *Brucella abortus*

3.2.1. Processo de Produção de uma Vacina

O processo de produção de vacinas pode ser dividido, de maneira simplificada, em três etapas: produção do princípio ativo (proteínas imunogênicas, no caso de vacinas usando metodologias biotecnológicas), formulação e envase [140].

A presente trabalho visa determinar, em base teórica, a etapa inicial da produção de vacinas, propondo uma metodologia biotecnológica eficaz e industrialmente aplicável para a produção de proteínas recombinantes de interesse.

3.2.2. Processo de Upstream

3.2.2.1. Identificação do Alvo

3.2.2.1.1. Proteína Ribossomal L7/L12

3.2.2.1.1.1. Imunogenicidade

A proteína L7/L12 é uma proteína de fusão essencial para o funcionamento do ribossomo da *Brucella* [68]. Segundo diversos estudos, dentre as proteínas imunogênicas atuantes durante a infecção, a L7/L12 é imunodominante para o desenvolvimento de vacinas de proteínas recombinantes contra brucelose bovina, pois, apesar de não produzir proteção suficiente quando utilizada na sua forma livre, produz resposta igual ou superior à obtida pela vacina B19 quando conjugada com outra proteína imunogênica ou com mediadores citosólicos [162, 179].

Estudos recentes indicam que a proteína L7/L12 induz importante resposta imune celular [172, 186]. Além de alto potencial imunogênico, o uso desta proteína apresenta diversas vantagens quando comparada a vacinas de bactéria atenuada, como não apresentar resultados falso-positivo em provas sorológicas de diagnóstico (que acontece devido a presença do LPS), não causar infecção do manipulador e ter custo relativamente baixo na produção [66, 161, 162, 163, 166].

Mallick et al (2007), demonstrou que a imunização com a proteína recombinante ribossomal L7/L12, quando administrada na sua forma livre, promove uma resposta imunológica forte, porém inferior a observada nas vacinas de bactérias atenuadas. Entretanto, caso esta proteína seja administrada com mediadores de entrega, como lipossoma derivados *E. coli*, observa-se forte resposta imunogênica, com alta produção de IgG2 [162].

Pakzad et al (2009) demonstrou que a proteína de fusão recombinante Albumina de Soro Humana – L7/L12 produzida em *Saccharomyces Cerevisiae* apresenta forte resposta humoral, com predominância de resposta humoral IgG1 e celular [122, 161, 177].

3.2.2.1.1.2. Gene *rplL*

O gene que codifica a proteína ribossomal L7/L12 é conhecido como *rplL* e está presente no cromossomo I da *Brucella abortus*. Este possui 375 pares de base e sua sequência de nucleotídeos pode ser visualizada no Anexo 01.

3.2.2.1.2. Lumazina Sintetase

3.2.2.1.2.1. Imunogenicidade

A proteína lumazina sintetase é uma enzima vital para o funcionamento da *Brucella abortus*, devido a sua participação na formação da riboflavina, vitamina essencial para biossíntese e crescimento bacteriano.

Segundo estudos recentes, esta proteína mostra-se imunodominante no desenvolvimento de resposta imunológica durante a infecção da brucelose bovina, pois além de induzir forte resposta celular, assim como a L7/L12, promove resposta humoral [183]. Além das vantagens mencionadas na utilização de antígenos para formação de vacinas, esta proteína possui estabilidade termodinâmica devido ao seu arranjo decamérico, facilitando a sua manipulação no processo industrial [183].

Velikovsky et al (2002) mostrou que a imunização por uma vacina de DNA em camundongos BALB/c com o gene que codifica a lumazina sintetase produz resposta tanto humoral, como celular [12]. Da mesma forma, Velikovsky et al (2003) mostrou que a mesma proteína induz resposta imunológica do tipo Th1 e Th2 na presença de diferentes adjuvantes, como o adjuvante incompleto de Freund (*IFA – incomplete Freund's adjuvant*), lipídeo A monofosforilado (*MPA – monophosphoryl lipid A*) e gel de hidróxido de alumínio [182].

3.2.2.1.2.2. Gene *ribH*

O gene que codifica a enzima lumazina sintetase é conhecido como *ribH* e está presente no cromossomo I da *Brucella*. Este possui 474 pares de base e sua sequência de nucleotídeos pode ser visualizada no Anexo 02.

3.2.2.1.3. Escolha do Vetor de Clonagem - Vetor Plasmidial pUC19

Os vetores de clonagem são veículos que permitem a multiplicação de um gene alvo inserido neste. Para que esta clonagem seja reproduzida, o vetor deve (a) ser capaz de se replicar independente do cromossomo da célula hospedeira, (b) aceitar a inserção do gene alvo em sua molécula de DNA, (c) possuir marcadores de seleção para identificação das células transformadas, (d) possuir sítio de clonagem, que é uma sequência de nucleotídeos que interagem com as enzimas de restrição, permitindo a inserção do DNA alvo, (e) origem de replicação (*Ori*), sequência específica do plasmídeo, com cerca de 1.000 pares de base, onde ocorre o início da replicação do

DNA e onde existe uma série de elementos regulatórios responsáveis pelo controle do número de cópias realizadas e (f) sítio de clonagem múltiplo (MCS – *multiple cloning site*) ou polylinker [140].

Atualmente, existem diversos vetores de clonagem que são selecionados segundo o tamanho e tipo do inserto e o sistema vivo de expressão [140]. Os plasmídeos são os vetores de clonagem mais utilizados atualmente, pois são facilmente obtidos a partir de células bacterianas, facilmente reintroduzidos nestas células, possuem capacidade autônoma de replicação e suportam fragmentos de até 10kb [140]. Como os genes *rplL* e *ribH* possuem, juntos, menos de 10 kpb (mil pares de base) e devido a facilidade de obtenção e manipulação de plasmídeos, estes são os vetores de clonagem recomendados para a otimização do processo de biotecnológico [176].

Vetores plasmidiais possuem vantagens com relação aos outros vetores de clonagem, como facilidade de purificação, alta eficiência de transformação, marcas de seleção adequadas para células transformadas e a capacidade de clonar porções de DNA de até 10kb. Existe, atualmente, um amplo número de vetores plasmidiais comerciáveis, sendo os principais pUC8, pGEM3Z e pUC19 [140].

O vetor pUC19 é o vetor de clonagem mais utilizado para produção de proteínas recombinantes e é circular, dupla fita de DNA e com 2686 pares de base. Como principais vantagens, quando comparado com outros vetores clássicos, estão a facilidade de obtenção, manipulação e diferenciação de bactérias transformadas de não transformadas, bem como a identificação de bactérias hospedeiras que possuem o

Fonte: University of California, Santa Cruz - Genome Browser Home. Disponível em:
<http://bio.classes.ucsc.edu/bio20L/info/content/molbio2/puc19.htm>. Acessado em: 11/08/2013.

3.2.2.2. Escolha do Sistema Vivo de Clonagem

Existem diversos sistemas vivos disponíveis para clonagem de genes específicos, tanto eucariotos como procariotos, e as bactérias são, na maioria dos casos, a primeira opção para a clonagem. Apesar de não realizarem modificações pós-traducionais e possuírem capacidade limitada de formar pontes, as bactérias apresentam diversas vantagens, como amplo conhecimento da sua genética e fisiologia, diversidade de vetores de clonagem compatíveis, facilidade do controle da expressão gênica, facilidade e rapidez no crescimento bacteriano, elevada multiplicação plasmidial e possibilidade de secreção do produto no meio de cultura [186].

Na produção de antígenos recombinantes para a vacina subcelulares, bem como na produção de plasmídeos purificados para a vacina de DNA contra a brucelose bovina, a gram-negativa *E. coli* vêm sido extensamente testada, sendo as cepas mais utilizadas a BL21 (DE3), DH5 alfa, M15 [12, 162, 163, 182, 183, 189].

Segundo estudos recentes, as cepas M15 e DH5 alfa mostram elevado número de cópias e fácil purificação quando transformadas com o gene que codifica a proteína L7L12 ou genes de fusão desta proteína com outras imunodominantes, como a P39 [162, 163, 189]. Já a cepa BL21 (DE3) mostra estas vantagens na tradução da proteína lumazina sintetase [12, 182, 183]. Como o objetivo deste trabalho é otimizar a produção dos antígenos, ambas as cepas devem ser testadas para a produção da proteína de fusão lumazina sintetase-L7/L12. Neste caso, a cepa que obtiver melhor crescimento (monitorado por OD_{600nm}), é recomendada para a próxima etapa do processo.

3.2.2.3. Formação do Gene de Interesse

Como descrito por Luo et al (2006), o procedimento para a obtenção de uma proteína de fusão consiste em quatro principais etapas: amplificação de um dos genes por PCR, amplificação do outro gene de interesse com remoção do códon de terminação (stop códon), purificação do produto do PCR seguido de fusão dos genes com T4 ligase e inserção do gene de fusão em vetor de clonagem [179, 183].

3.2.2.3.1. Amplificação dos Genes *ribH*

Primeiramente, uma fase de leitura aberta do gene *ribH*, que codifica a enzima Imazina sintetase, foi amplificado utilizando técnica de PCR a partir do genoma da *B. abortus*, comumente a cepa RB51. Para os gene *ribH*, os primers e enzimas de restrição recomendados estão mostrados na Tabela 12. Após o PCR, os produtos devem ser identificados, separados e purificados por eletroforese por gel de agarose [179, 183, 187, 188].

Tabela 12: Primers para Amplificação do gene *ribH* por PCR

Gene	Sequência de Primer	Enzima de Restrição
FO	5'-GACGGATCCATCGAGTTTCTC-3'	<i>Bam</i> HI
RO-1	3'-GCCGGGCCCCCTAGTATCAGTT-5'	<i>Xma</i> I

Fonte: National Center for Biotechnology Information. Gene. *ribH* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941].

3.2.2.3.2. Amplificação do Gene *rplL* e Remoção do Códon de Terminação

Após amplificação do gene *ribH*, amplificou-se, por PCR, o gene L7/L16, gene que codifica a proteína ribossomal L7/L12 sem o códon de terminação (*stop codon*) TAA. Os primers e enzimas de restrição recomendados estão mostrados na Tabela 13. Após o PCR, os produtos devem ser identificados, separados e purificados por eletroforese por gel de agarose [179, 183, 187, 188].

Tabela 13: Primers para Amplificação do gene *rplL* por PCR

Gene	Sequência de Primer	Enzima de Restrição
FL	5'-GACAAGCTTATGGCTGATCTCG-3'	<i>Hind</i> III
RL-2	3'-GCCCCTAGGTTGAGTTC-5'	<i>Bam</i> HI

Fonte: National Center for Biotechnology Information. Gene. *rplL* 50S ribosomal protein L7/L12 [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941].

3.2.2.3.3. Fusão dos Genes das Proteínas Recombinantes

Para a construção do plasmídeo com a proteína de fusão recombinante BLS-L7/L12-pUC19, o produto do PCR obtido no item 3.2.2.3.2 e o gene amplificado da lumazine sintetase foram digeridos com *Bam*HI, formando pontas coesivas complementares no final da sequência reverse do gene *rpL* sem o *stop codon* e no início do gene de *ribH*. Após digestão, as pontas coesivas complementares formadas são ligadas entre si pela enzima ligase T4, formando o gene de fusão *rpL-ribH* [179, 183, 187, 188].

3.2.2.3.4. Inserção do Gene de Fusão no Vetor de Clonagem

O gene obtido da fusão dos genes *rpL* e *ribH* foi, então, inserido no plasmídeo pUC19 através da digestão do plasmídeo e do gene com as enzimas de restrição *Xma*I e *Hind*III, que formam pontas coesivas complementares entre o plasmídeo e o gene de fusão. Portanto, esta técnica permite ligação, de forma adjacente, de ambos os genes em uma só janela de leitura [179, 183, 187, 188, 189]. A sequência de restrição das enzimas utilizadas em todas as etapas do processo de formação do gene de fusão podem ser observada na Tabela 14.

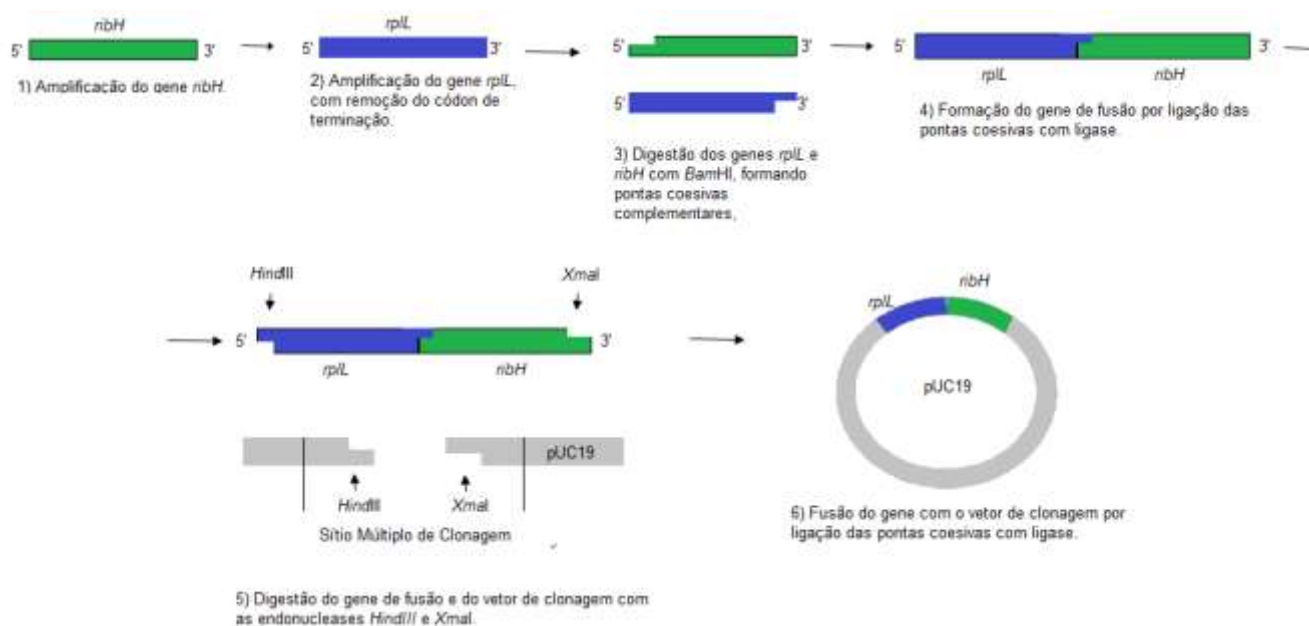
Tabela 14: Enzimas de Restrição

Enzimas de Restrição	Origem	Sequência de restrição	Extremidade
<i>Xma</i> I	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	5'-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-	Coesiva
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-	Coesiva
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenza</i>	5'-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-	Coesiva

Fonte: Lodish, H. et al. *Molecular Cell Biology*. ed.4. New York. W.H. Freeman and Company. p.362. 1999.

Um esquema representativo da formação da proteína de fusão pode ser observado na Figura 11.

Figura 11: Esquema de Formação do Gene de Fusão e Inserção no Vetor de Clonagem



Fonte: Lodish, H. et al. *Molecular Cell Biology*. ed.4. New York. W.H. Freeman and Company. p.362. 1999.

3.2.2.4. Formação de Células Hospedeiras Competentes

Para as bactérias tornarem-se competentes, ou seja, para que estejam aptas a receberem um DNA exógeno, é necessário tratamento químico com íons divalentes (como o cloreto de cálcio, lítio ou magnésio) seguido de tratamento térmico, com variação brusca de temperatura [190]. Esta técnica promove mudança da permeabilidade da membrana celular, pois os íons divalentes positivos diminuem a repulsão entre os fosfolipídios de membrana e o DNA exógeno, facilitando a entrada do plasmídeo [190].

Quando as bactérias tornam-se competentes, a eficiência da transformação aumenta significativamente. Portanto, recomenda-se que o tratamento seja realizado com cloreto de cálcio. De maneira resumida, deve-se cultivar a bactéria hospedeira em meio adequado (como meio Luria-Bertani), por 24 horas, à 37°C e sob agitação. Em seguida, deve-se centrifugar o cultivo a frio (4°C), a fim de separar as bactérias do meio de cultura e lavar as bactérias com cloreto de sódio também à baixa temperatura. Recomenda-se que o protocolo de transformação seja realizado logo em seguida [140].

3.2.2.5. Transformação (Vetor de Clonagem)

A transformação por choque térmico é um método fácil e relativamente barato que consiste na mudança de temperatura de 4° para 42°C, criando poros na membrana da célula hospedeira previamente tratada com cloreto de cálcio, permitindo inserção do DNA exógeno [192, 193].

3.2.2.6. Métodos de Seleção de Recombinantes

As células transformadas, ou seja, que tiveram o plasmídeo inserido no seu interior, podem ser diferenciadas das não transformadas pelo crescimento em meio contendo ampicilina. Como o vetor de clonagem pUC19 possui o gene de resistência a esse antimicrobiano, somente bactérias transformadas sobrevivem [192].

Além da diferenciação das células transformadas para não transformadas, as células que possuem o plasmídeo que contém o gene de interesse inserido devem ser diferenciadas das células que possuem somente o plasmídeo. Como o gene alvo é inserido no MCS presente no lac Z, estas células podem ser identificadas por crescimento em meio ágar contendo isopropil-tio- β -galactosídeo (IPTG), indutor do gene lac Z que codifica a beta-galactosidase e 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (x-gal), substrato da enzima beta-galactosidade [192].

Bactérias que não possuem o inserto possuem o gene lac Z completo e são capazes de produzir, por indução do IPTG, a enzima beta-galactosidase. Esta enzima, por sua vez, catalisa a reação de hidrólise de x-gal, formando substrato de coloração azul. Já bactérias que possuem o gene no inserto no lac Z não formam a enzima, mantendo coloração normal da colônia (branca) [192].

3.2.2.7. Cultivo das Células Transformadas

As células adequadamente transformadas devem, portanto, serem identificadas, em seguida, inoculadas em meio líquido adequado para crescimento bacteriano. Recomenda-se a inoculação em meio Luria-Bertani (LB), de um a dois dias, à 35°C e

sob agitação. O tempo e a temperatura foram determinados por estudos de curva de crescimento e temperatura ótima para desenvolvimento destas bactérias [140].

3.2.2.8. Extração de Plasmídeos Bacterianos

A purificação do inserto é uma etapa fundamental no processo de obtenção de proteínas recombinantes. Esta metodologia permite a separação do DNA plasmidial dos restos celulares, como proteínas, DNases e DNA endógeno.

Para a *E. coli*, existem kits comerciais que permitem extração rápida destes plasmídeos. Nestes, existem diferentes soluções que precipitam o DNA plasmidiano, sem que haja contaminação deste com restos celulares.

As soluções comerciais combinam (a) agentes quelantes, que impedem ação de DNases, (b) detergentes (como o dodecilsulfato de sódio) e substâncias alcalinas, que degradam a membrana e parede celular, expõe o conteúdo citoplasmático do micro-organismo e desnaturam parcialmente as proteínas, (c) solução com sal de potássio, que se liga e precipita proteínas parcialmente desnaturadas, DNA endógeno e outros compostos, permitindo que o plasmídeo fique isolado no sobrenadante, (d) solventes orgânicos, que extraem o plasmídeo e garantem que este encontra-se isolado na solução aquosa e (e) álcool isopropílico, que muda a constante dielétrica do meio, permitindo precipitação do plasmídeo isolado [192, 195].

Com o plasmídeo purificado, faz-se nova digestão com enzimas de restrição específicas *XmaI* e *HindIII* para separação, purificação e identificação da gene de interesse por eletroforese em gel de agarose.

O inserto purificado é, em seguida, ligado, pela enzima ligase T4, em um vetor de expressão previamente digerido com as enzimas *Xma*I e *Hind*III, para início da expressão da proteína.

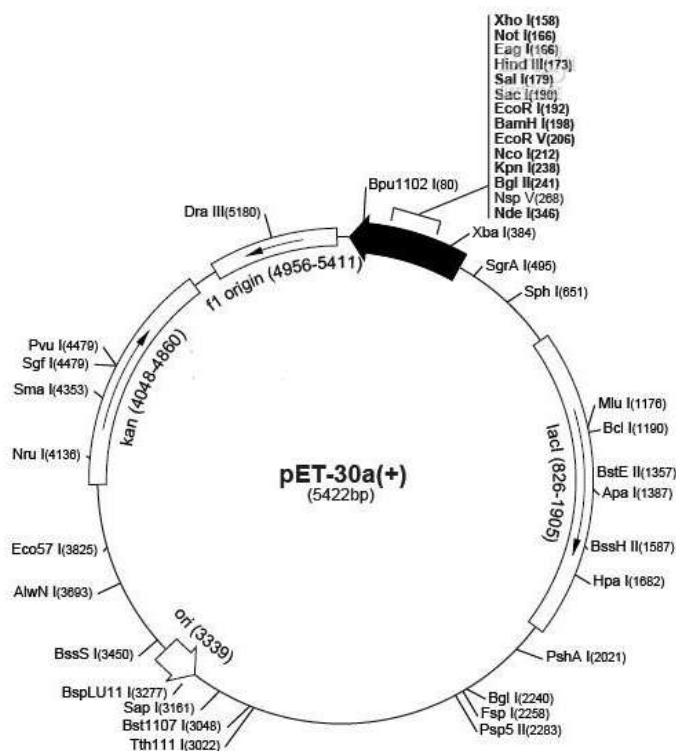
3.2.2.9. Escolha do Vetor de Expressão e Célula Hospedeira

Da mesma forma que o vetor de clonagem, um vetor de expressão deve possuir uma origem de replicação, um marcador para seleção e um sítio múltiplo de clonagem (MCS) [186, 196]. Porém, além dos requisitos citados, este também deve possuir (a) região promotora para transcrição forte e regulável, que mantém os níveis basais de expressão e só inicia a produção em grande escala na presença de um indutor, (b) sequência de ligação do ribossomo (sinal Shine-Dalgarno) que indica o início da tradução adjacente ao códon inicial ATG e (c) sistema de repressão para controle adequado da tradução [186, 196].

Os promotores mais utilizados possuem sequências de 10 a 35 pares de base e elemento UP, que estimula a transcrição. Os promotores devem (a) ser eficientemente reconhecido pela RNA polimerase, (b) ter regulação forte, ou seja, um nível baixo de expressão basal devido ao gene regulador, (c) ter fácil indução (térmica ou química) e (d) estar posicionado de 10 a 100 pb da sequência de Shine-Dalgarno [186, 196]. Dentre os promotores comercialmente disponíveis, o mais utilizado é o T7, que é regulado pelo operon lac e induzido por IPTG ou termicamente [186]. A RNA polimerase T7 tem origem viral e promove a transcrição de forma constante e rápida [200], sendo recomendado para a expressão das proteínas.

O vetor de pET30a(+) é um plasmídeo bacteriano de expressão capaz de produzir, de forma rápida, grande quantidade da proteína alvo inserida em seu DNA. Este vetor possui, em seu genoma, (a) gene lac I, que codifica a proteína repressora lac, (b) promotor T7 específico para a polimerase viral T7 RNA pol, adjacente ao local de inserção do gene de interesse, (c) repressor lac, que regula a transcrição e está localizado adjacente ao promotor T7, (d) MCS com sítios de restrição para diversas enzimas (e) origem de replicação FL, (f) gene de resistência a kanamicina e (g) origem de replicação ColE1 [197, 200]. Um esquema representativo do vetor pET está mostrado na Figura 12.

Figura 12: Vetor de Expressão pET30a(+)



Fonte: DH-gate. Disponível em: <http://pt.dhgate.com/product/pet30a-vector-expression/158945184.html>.

Acessado em: 11/08/2013.

O vetor de expressão pET já foi utilizado em diversos estudos para a produção de proteínas recombinantes contra a brucelose bovina [179]. A expressão da proteína de interesse acontece somente na presença da enzima RNA polimerase T7 (a célula hospedeira seja geneticamente modificada com a incorporação do gene da RNA polimerase T7) e na ausência de repressão (pela proteína repressora produzida pela tradução do gene lac).

Ao entrar em contato com a lactose ou o IPTG, a proteína repressora presente na região promotora T7 é deslocada, permitindo transcrição do gene que codifica a RNA polimerase T7, no genoma da bactéria, e o gene de interesse, no plasmídeo de expressão [198, 199, 200]. Como o promotor T7 é viral, a transcrição acontece de forma rápida e constante, com aumento brusco do RNAm do gene de interesse no interior da célula [198, 200].

Estudos recentes indicam que o uso da célula hospedeira *E. coli* BL(DE3) é o mais indicado para expressão de proteínas recombinantes [197, 200], sendo utilizada em diversos estudos para a produção de antígenos contra a brucelose bovina [182]. A razão da eficiência destas células deve-se ao fato da deficiência em proteases que possam degradar as proteínas durante o processo de purificação e das proteínas se tornarem mais estáveis nessas linhagens [202].

3.2.2.10. Transformação (Vetor de Expressão)

Para garantir que a transformação da bactéria seja adequada, é recomendado a realização da eletroporação. Resumidamente, as células são imersas em solução aquosa e submetidas a choques elétricos de alta voltagem, formando poros na membrana, que permitem a entrada do DNA plasmidial [176].

Este método pode ser realizado para fungos, células animais, vegetais e bactérias com ajuste do eletroporador em duração, intensidade e capacitância [193, 201]. Apesar de alta eficiência, a eletroporação deve ser realizada com cautela devido a possíveis perdas do material genético que este procedimento gera.

3.2.2.11. Métodos de Seleção de Recombinantes

A seleção dos recombinantes utilizando o vetor de expressão pET30a(+) pode ser realizada por inoculação em meio contendo kanamicina, devido ao plasmídeo possuir gene de resistência a este antimicrobiano. Portanto, para a seleção das células transformadas, é necessário a inoculação em ágar LB contendo o antimicrobiano a 37°C, de 1 a 2 dias e sob agitação [176, 202].

Apesar de diferenciar as células transformadas das não transformadas, o cultivo em meio com kanamicina não diferencia células que possuem o plasmídeo com o inserto das que possuem somente o plasmídeo. Portanto, para seleção correta das

células, deve-se realizar o sequenciamento dos clones ou a hibridização in situ de colônias [176, 202].

O sequenciamento é baseado no método de terminação de cadeia ou Sanger-Coulson e permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um determinado seguimento de DNA por sequenciamento com pares de base marcados com fluorcromos [176, 201, 203]. Já a hibridização in situ baseia-se no fato da ligação de fragmentos de DNA marcados (sonda) disponíveis na fita de DNA de interesse. Esta hibridização acontece na região de homologia da célula, permitindo sua localização e sequência de nucleotídeos [194].

3.2.2.12. Expressão Proteica

A indução da proteína de expressão pode ser otimizada pelo monitoramento de parâmetros antes e após a indução. A densidade óptica, para escala laboratorial, e a porcentagem de oxigênio, temperatura e pH, para escala piloto, são os principais parâmetros monitorados [202].

Em escala laboratorial, a indução é monitorada através da densidade óptica a 600nm, sendo ideal quando esta atinge entre 0,6-1 [202]. Para o escalonamento, as bactérias transformadas devem ser inoculadas sob agitação em meio rico em nutrientes e sais traços, como o LB ou o meio K12 fermentador.

Como a presença de glicose do meio inibe o consumo de lactose necessário para a indução, é necessário monitorar a porcentagem de oxigênio. Enquanto o

oxigênio diminuir, a bactéria está crescendo e consumindo-o para a produção de energia. Porém, quando a concentração de O₂ no meio iniciar sua ascensão, pode-se iniciar o fed-batch (caso necessário) ou a indução. A porcentagem ideal de oxigênio para início da indução é determinada experimentalmente e a indução pode acontecer com lactose ou IPTG. Este processo leva a formação da enzima RNA polimerase T7 e, consequentemente, a transcrição das proteínas recombinantes [202, 204].

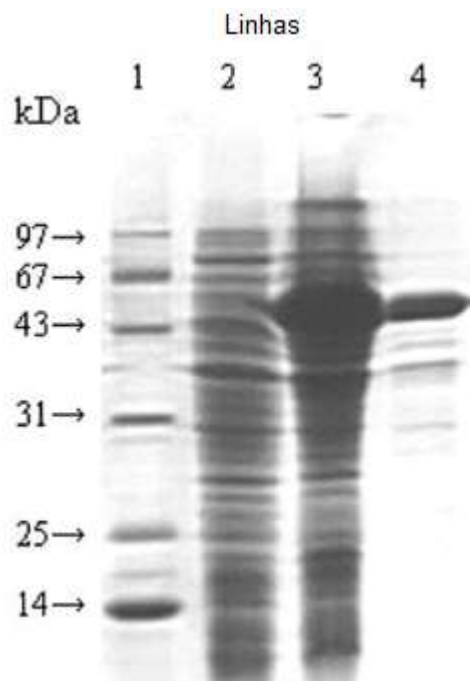
A temperatura e pH ótimos para crescimento da bactéria *E. coli* são 37°C e pH neutro, devendo ser controlado com solução aquosa básica e ácida. A indução normalmente é realizada com IPTG 0,2mM, sendo que esta pode durar de 3 a 12 horas [202].

Como a proteína de fusão não é secretada, a superprodução das proteínas recombinantes leva a formação de corpúsculo de inclusão insolúvel no citoplasma bacteriano, sendo necessário lise e solubilização deste para sua atividade imunogênica [202]. Apesar do método de secreção proteica ser mais fácil, o enovelamento proteico fica prejudicado, pois a conformação incorreta é rapidamente degradada no citoplasma da proteína [191, 207].

A formação do corpúsculo de inclusão acontece devido à alta expressão proteica e da pequena quantidade de chaperonas no citoplasma. Este corpúsculo é vantajoso devido ao alto grau de pureza, alto rendimento, alta concentração de proteínas recombinantes, pouco contaminante e forte proteção contra proteases citoplasmáticas [160, 168, 191].

A indução é verificada por eletroforese (SDS) em gel de poliacrilamida e as condições dessa etapa são fundamentais para resolver problemas como baixo crescimento celular e baixa indução [202]. A Figura 13 mostra gel de SDS-Page de diferentes tempos de fermentação durante a produção da proteínas de fusão L7/L12-Omp16, que são antígenos fortemente imunogênicos no combate a brucelose bovina. No estudo, Luo et al (2006) mostra (1) marcador de peso molecular, (2) célula transformada com plasmídeo antes da indução, (3) célula transformada com plasmídeo após a indução (onde é possível observar alta concentração da proteína de fusão entre 43 e 67kDa), (4) proteína de fusão purificada [179].

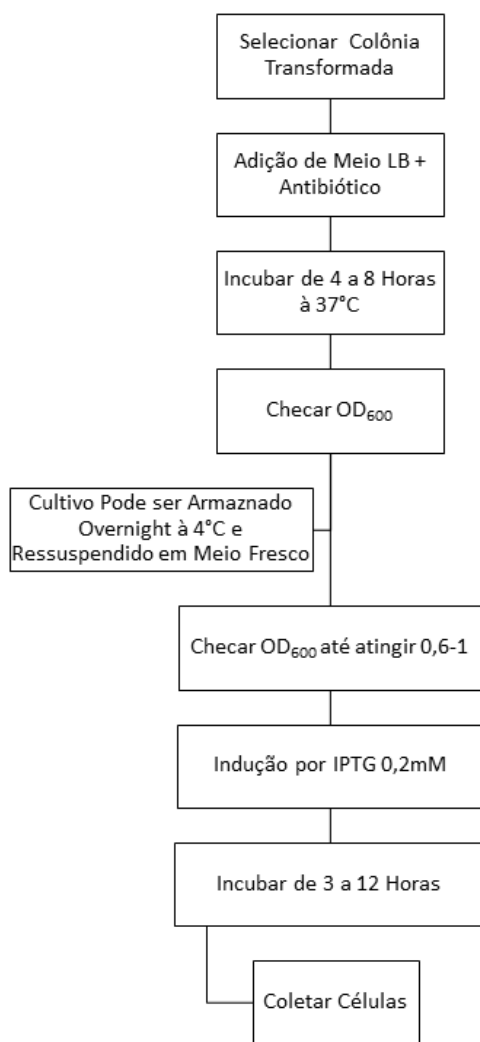
Figura 13: SDS-Page de Diferentes Amostras da Fermentação



Fonte: Adaptado de Luo, D.; Ni, B.; Li, P.; Shi, W.; Zhang, S.; Han, Y.; Mao, L.; He, Y.; Wu, Y.; Wang, X. Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. **Journal of Infection and Immunity**. v.74, n.5, p. 2734–2741. 2006. Legenda: (1) marcador de peso molecular, (2) célula transformada com plasmídeo antes da indução, (3) célula transformada com plasmídeo após a indução, (4) proteína de fusão purificada.

De maneira geral, as etapas do crescimento celular, desde a seleção dos recombinantes até a purificação das proteínas podem ser observados na Figura 14.

Figura 14: Fluxograma de Crescimento Celular



Fonte: MERCK. Como melhorar sua Expressão de Proteínas Recombinantes em *E.coli* [202].

3.2.3. Processo de *Downstream*

3.2.3.1. Clarificação

A clarificação é realizada após o fim da fermentação para separação das células hospedeiras contendo as proteínas de interesse do meio de cultura. Como o corpúsculo de inclusão permanece no interior do citoplasma, o sobrenadante é descartado e o pellet é ressuspendido em solução tampão para o início do processo de rompimento celular [8].

3.2.3.2. Rompimento Celular

A lise celular, também conhecida como rompimento celular, deve ser realizada para remover o corpúsculo de inclusão do interior da célula hospedeira. Esta técnica pode ser realizado por diferentes métodos dependendo do tipo e tamanho do micro-organismos hospedeiro, tensões de cisalhamento, tempo, rendimento e temperatura do processo, equipamentos disponíveis e custo [205].

Os principais métodos de rompimento celular são mecânicos (homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, prensa francesa e ultra-som), não-mecânicos (choque osmótico, congelamento ou descongelamento, aquecimento e secagem), químicos (álcalis, solventes, detergentes e ácidos) e enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular) [205].

O homogeneizador de alta pressão (HAP) é uma das técnicas mais eficazes para o rompimento celular, é o mais utilizado em escala piloto e promove um alto rendimento de rompimento para a bactéria *E. coli* devido sua baixa tensão de cisalhamento. Porém,

por promover o aumento da temperatura do meio durante o processo, deve ser realizado acoplado a um sistema de resfriamento para evitar danos as proteínas recombinantes [205].

O tampão de rompimento normalmente é o Tris pH neutro e pode conter aditivos que promovam uma purificação parcial do corpúsculo de inclusão [159]. Dentre os aditivos, o mais utilizado é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), composto quelante que se liga a metalo-enzimas, impedindo que estas degradem o corpúsculo de inclusão [159, 206].

Após o rompimento celular e centrifugação, preferencialmente à baixas temperaturas e 12.000 g, o sobrenadante resultante, que contém homogeneizado de restos celulares, é descartado, e o pellet contendo o corpúsculo de inclusão e fragmentos celulares é submetido a lavagens para a sua purificação [159, 202, 205].

3.2.3.3. Purificação e Solubilização das Proteínas

O pellet formado após o rompimento celular é composto 99% pelas proteínas de interesse insolúveis e inativas [170, 202] e, para garantir que durante a solubilização, a presença de contaminantes seja minimizada, realiza-se lavagem deste pellet com solução tampão contendo aditivos, como sais e detergentes fracos [171, 178].

O tampão e número de lavagens deve ser determinado experimentalmente, garantindo que ocorra solubilização seletiva dos contaminantes do corpúsculo, sem

solubilizar as proteínas de interesse. O tampão de lavagem deve possuir pH adequado e possíveis aditivos que auxiliem na solubilização parcial de contaminantes. Dentre os aditivos mais utilizados, destacam-se agentes quelantes, como o EDTA, inibidores de protease, como o fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), detergentes fracos, como Triton X-100 e Tween-20 e sais, como o cloreto de sódio [171, 178].

Entre as lavagens, é necessário centrifugação sob resfriamento e consequente descarte do sobrenadante, e SDS-Page, para monitoramento das eficiência das lavagens e possível perda das proteínas de interesse no sobrenadante [158, 178].

Rotineiramente, após a lavagem, a solubilização do corpúsculo de inclusão é realizada com agentes altamente desnaturantes (detergentes fortes), como a guanidina ou ureia 8M, podendo alterar a estrutura e atividade das proteínas [159, 169]. Por isso, recomenda-se solubilização com solução tampão de pH elevado, como o Tris-Base pH 12,5, e sob agitação, sendo o pH ideal determinado experimentalmente [23].

Como não ocorre a adição de detergentes fortes, a renaturação (*refolding*) pela retirada lenta da ureia não é necessária, eliminando um passo e reduzindo custo do processo.

3.2.3.4. Caracterização da Proteína Obtida

O teste de caracterização pode ser realizado por diferentes métodos, como eletroforese em gel de poliacrilamida seguido de coloração com Coomassie-blue e nitrato de prata, *imunoblotting* (*western blot* com anticorpos anti-proteína recombinante),

determinação do ponto isoelétrico, testes de aglomeração proteica, dicroísmo circular (para observação da estrutura secundária das proteínas), técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) analítica, e técnicas espectrofotométricas [161, 162, 171, 178].

3.2.3.5. Teste de Atividade

3.2.3.5.1. Imunização

O teste de atividade in vivo deve ser realizado em camundongos BALB/c anestesiados. Recomenda-se imunização intramuscular da solução contendo as proteínas imunogênicas e das soluções controle [12].

Para o teste experimental in vivo, recomenda-se três diferentes grupos de camundongos BALB/c, sendo cada grupo composto por quinze animais. São estes (a) grupo controle, que recebe injeção de solução salina tamponada (PBS) sem as proteínas recombinantes, (b) grupo teste, que recebe a injeção de PBS com as proteínas imunogênicas solubilizadas e (c) grupo comparativo, que recebe dose recomendada da vacina B19 disponível comercialmente.

Recomenda-se aplicações nos dias 0, 15, 30 e 45 do experimento, sendo a coleta de soro realizada 15, 30, 45 e 60 dias após a primeira imunização [12].

3.2.3.5.2. Determinação de Anticorpos Específicos

A presença de anticorpos específicos no plasma sanguíneo pode ser determinado por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto, ensaio

imunoenzimático que determina quantitativamente a presença de anticorpos em todos os tempos de imunização [12, 83, 161, 175].

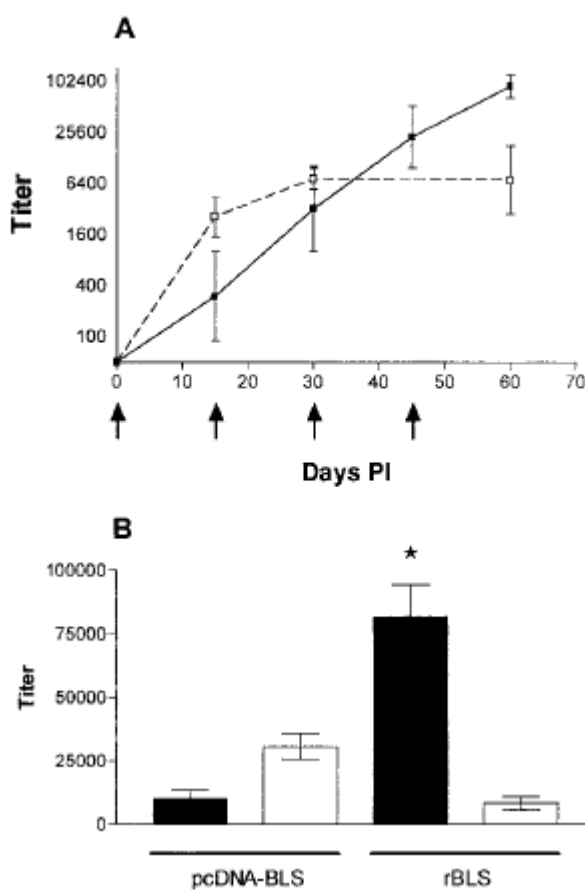
Para a identificação de anticorpos anti-lumazina sintetase e anti-proteína ribossomal L7/L12 por ELISA indireto, os poços de poliestireno devem ser adsorvidos com concentração conhecida estes antígenos ou adquiridos comercialmente. Caso o plasma sanguíneo diluído dos camundongos BALB/c em teste possua anticorpos, estes se ligarão aos antígenos formando um complexo antígeno-anticorpo primário. Em seguida, adiciona-se um segundo anticorpo (anti-anticorpo primário) conjugado com a enzima peroxidase, formando o complexo antígeno – anticorpo primário – anti-anticorpo conjugado. Como o conjugado é uma enzima, após a adição do substrato desta, ocorre formação de um produto colorido, permitindo leitura em espectrofotômetro [161, 175, 174].

O valor limite (cutoff) para o ensaio deve ser calculado utilizando o plasma sanguíneo de camundongos BALB/c não-imunizados [12, 161] e a intensidade da cor está diretamente relacionada com a quantidade de anticorpos primários presentes no plasma [175].

Velikovsky et al (2002) comparou a produção de anticorpos frente a uma imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante lumazina sintetase (rBLS) e com plasmídeo contendo o gene codificante da lumazina sintetase (pcDNA-BLS) utilizando o ensaio de ELISA. Neste estudo, como mostrado na Figura 15A, foi possível observar uma forte resposta humoral após ambas as imunizações, sendo a imunização com o plasmídeo (quadrados cheios) mais representativa que a com a proteína recombinantes isolada (quadrados ociosos). Adicionado a isso, o ensaio de ELISA também permitiu a identificação dos perfis dos isotipos dos anticorpos dos

camundongos BALB/c imunizados 60 dias após a primeira dose. Neste caso, como mostra a Figura 15B, a produção de IgG1 (barra preta) após imunização com o plasmídeo pcDNA-BLS foi significativamente menor do que com a rBLS, enquanto a produção de IgG2 (barras brancas) não mostrou diferença significativa [12].

Figura 15: Caracterização da Produção de Anticorpos por Ensaio de ELISA



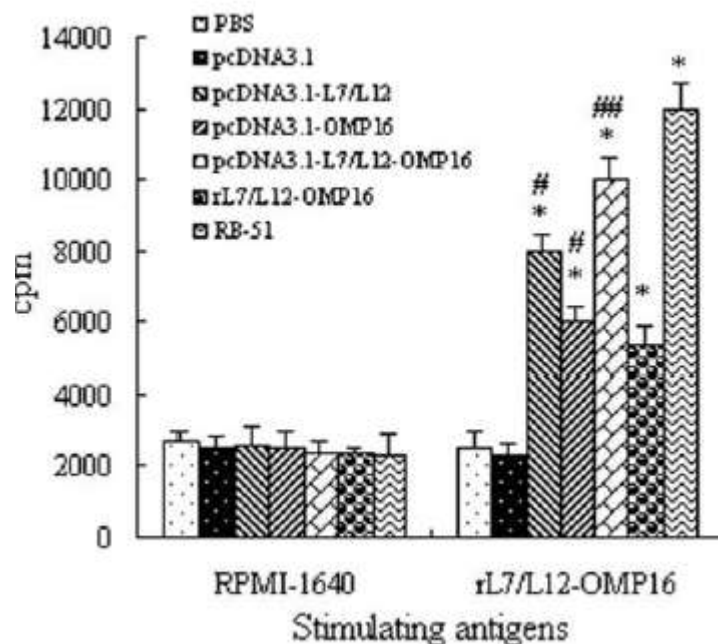
Fonte: Velikovsky, C.; Cassataro, J.; Giambartolomei, G.; Goldbaum, F.; Estein, S.; Bowden, R.; Bruno, L.; Fossati, C.; Spitz, M.A. DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Infect Immun.** v.70, p.2507-11. 2002.

3.2.3.5.3. Determinação da Proliferação de Linfócitos e INF-gama

Após duas semanas do início da imunização, cinco camundongos BALB/c de todos os grupos experimentais devem ser sacrificados e seus baços retirados de forma asséptica. Após a lise celular do baço e ressuspensão em tampão apropriado, a solução deve ser inoculada em meio ágar triptona de soja enriquecido [12, 179]. As placas devem ser mantidas à 37°C, 5% CO₂, de 1 a 3 dias e sob agitação e as células cultivadas devem ser testadas para proliferação de linfócitos através de estimulação com antígeno específico. A estimulação acontece in vitro com as proteínas recombinantes purificadas e em triplicata e o resultado é apresentado em unidade formadora de colônia (UFC) por grupo [12, 161, 179].

Luo et al (2006) realizou ensaio de proliferação de linfócitos após imunização de camundongos BALB/c com vacina de DNA contendo genes das proteínas L7/L12 e Omp16 de *Brucella abortus*. Neste ensaio, como mostrado na Figura 16, comparou-se a estimulação de linfócitos com o antígeno purificados recombinante rL7/L12-Omp16 e o meio RPMI 1640 (controle) após a imunização com PBS (branco), plasmídeo sem inserto, plasmídeo contendo gene da proteína L7/L12, plasmídeo contendo o gene da proteína Omp16, plasmídeo contendo o gene de ambas as proteínas e a vacina com a bactéria atenuada *B. abortus* RB51, observando que a estimulação de linfócitos com o plasmídeo contendo os genes de ambas as proteínas, apesar de ser menor que o observado na vacina com a bactéria atenuada, é significativamente maior do que com os genes isolados [179].

Figura 16: Estimulação de Linfócitos Após Imunização com Vacina de DNA contra *B. abortus*

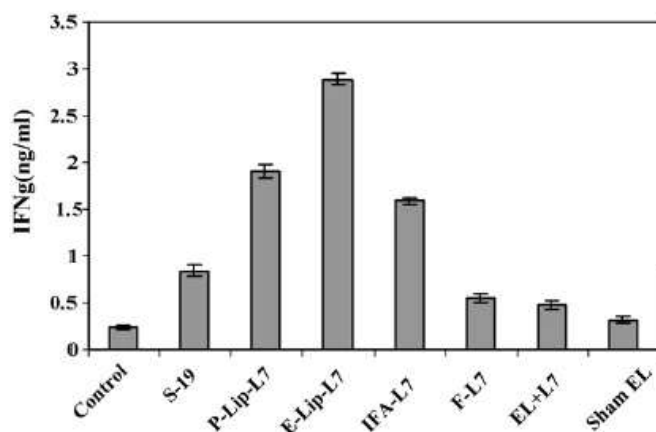


Fonte: Luo, D.; Ni, B.; Li, P.; Shi, W.; Zhang, S.; Han, Y.; Mao, L.; He, Y.; Wu, Y.; Wang, X. Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. **J Infection and Immunity**. v. 74, n.5, p. 2734–2741. 2006.

Já para a determinação de INF-gama, o sobrenadante, após centrifugação do cultivo da solução contendo o lisado do baço, deve ser estimulado com antígenos das proteínas imunogênicas lumazina sintetase e L7L12. Em seguida, este sobrenadante deve ser inoculado em meio contendo soro fetal de bezerro à 10% e cultivado a 37°C, 5% CO₂ por 48 horas. Por fim, após centrifugação do cultivo, o sobrenadante diluído deve ser submetido a ensaio de ELISA em triplicata em placas contendo anticorpos anti-INF-alfa adsorvidos em sua placa [162].

Mallick et al (2007) estudou a produção de INF-gama em camundongos BALB/c após imunização por diferentes mecanismos da proteína L7/L12 recombinante. Após o ensaio de ELISA, observou-se, como mostra a Figura 17, que a concentração de INF-gama no sobrenadante de células do baço estimuladas foi maior após imunização com E-Lip-L7 (proteína L7/L12 aprisionada em lipossoma derivado de *E.coli*), P-Lip-L7 (proteína L7/L12 aprisionada em lipossoma derivado fosfatidilcolina/colesterol de ovo) e IFA-L7 (proteína L7/L12 com adjuvante de Freund completo), respectivamente, indicando que a proteção é maior quando a proteína é carregada por lipossoma ou acompanhada de adjuvantes [162]. Já na estimulação com Control (antígeno controle), S19 (*Brucella* S-19), F-L7 (proteína L7/L12 livre), EL + L7 (lipossoma de *E. coli* + proteína L7/L12 livre) e Sham EL (lipossoma de *E. coli*) não houve produção significativa de INF-gama.

Figura 17: Produção de INF-gama Após Imunização de Camundongos BALB/c



Fonte: Mallick, A.I.; Singha, H.; Khan, S.; Anwar, T.; Ansari, M.A.; Khalid, R.; Chaudhuri, P.; Owais, M. Escheriosome-mediated delivery of recombinant ribosomal L7/L12 protein confers protection against murine brucellosis. **Vaccine**. v.25, n.46, p.7873-7884. 2007.

3.2.3.5.4. Determinação da Produção de Citocinas

A determinação da produção de citocinas após a imunização pode ser determinada pela análise quantitativa do RNA mensageiro (RNAm) de citocinas por PCR de transcriptase reversa (RT-PCR) [12].

O RT-PCR é uma técnica em que ocorre reação da transcriptase reversa do RNAm de citocinas, seguida de PCR. Portanto, ao contrário do PCR tradicional, este não utiliza o DNA dupla fita como molde. A partir do RNAm, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (DNAc), sendo, em seguida, amplificado por PCR [12, 173].

Recomenda-se que os produtos do PCR sejam separados por eletroforese em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon, hibridizados com oligonucleotídeos marcados e visualizados por detector de quimiofluorescência [12, 173].

4. **CONCLUSÃO**

Novas estratégias de imunização são necessárias não só para prevenir a brucelose bovina, mas para diminuir as desvantagens nas vacinas de bactéria atenuada atualmente comercializadas.

Apesar das proteínas isoladas não conferirem uma imunização suficientemente forte para substituição das vacinas de bactérias atenuadas, novos métodos de entrega dos antígenos vêm ganhando destaque, como (a) utilização de vacinas de DNA, (b)

utilização de vacinas de RNA, (c) vacinas com mais de uma proteína imunogênica ou (d) acoplamento destas proteínas a lipossomas e outros carregadores.

O estudo de novas técnicas e a otimização dos processos de produção e purificação de proteínas antigênicas recombinantes vêm tornando as vacinas subcelulares uma opção viável para a proteção eficaz do rebanho. Sabe-se que a vacina ideal para o combate da infecção deve promover resposta imune celular e humoral. A proteína ribossomal L7/L12 têm sido descrita como uma proteína imunogênica chave para o desencadeamento de uma resposta celular dominante, enquanto a lumazina sintetase, além de estável termodinamicamente, mostrou-se forte indutor de resposta celular e humoral. Portanto, a combinação de ambas as proteínas imunogênicas mostra-se promissora no desenvolvimento de vacinas subcelulares, seja na sua forma livre, ou por sistema de entrega.

5. REFERÊNCIAS

- [1] SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A SAÚDE ANIMAL (SINDAN). Mercado. 2012.
Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>. Acesso em: 21 maio 2013.
- [2] WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Logros de la OIE en el ámbito del bienestar animal.
Disponível em: <http://www.oie.int/es/bienestar-animal/temas-principales>. Acesso em: 21 maio 2013.
- [3] ALVES, D.D.; GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.3, p.135-149, 2005.
- [4] PAULIN, I. M.; FERREIRA NETO, J.S. O combate à brucelose bovina: situação brasileira, Jaboticabal. FUNEP, p.154. 2003.
- [5] PACHECO, A.M. et al. A Importância da brucelose bovina na saúde pública. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n.11, 2008.
- [6] AGÊNCIA UNIVERSITÁRIA DE NOTÍCIAS USP. Vacinas recombinantes conciliam melhores custos, produção e eficácia.
Disponível em: <http://www.usp.br/aun/exibir.php?id=4549>. Acesso em: 22 maio 2013.
- [7] BRASIL GLOBAL. O mercado brasileiro para vacinas veterinárias originárias do Uruguai.
Disponível em: <http://www.brasilglobalnet.gov.br/ARQUIVOS/PSCI/PSCIUruguaiVacinas.pdf>. Acesso em: 12 set 2012.
- [8] BIOLOGIA CELULAR. Fraccionamento celular. Universidade de Évora.
Disponível em: www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/fraccionamentotecnica.htm. Acesso em: 01 ago 2013.
- [9] CAPANEMA, L.; VELASCO, L.; SOUZA, J.; NOGUTTI, M. BNDES Setorial. Panorama da Indústria Farmacêutica Veterinária.
Disponível em:
http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2506.pdf. Acesso em: 08 ago 2012.
- [10] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília: Mapa/DAS/DAS, p.188. 2006.
Disponível em:
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf. Acesso em: 13 ago 2012
- [11] KURAR, E.; SPLITTER, G. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. **Vaccine**. v.15, p.1851-1857, 1997.

- [12] VELIKOVSKY, C.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.; GOLDBAUM, F.; ESTEIN, S.; BOWDE, R.; BRUNO, L.; FOSSATI, C.; SPITZ, M.A. DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Infect Immun.** v.70, p.2507-11, 2002.
- [13] GUIDO, M.C.; GRASSO, L.M.P. Brucelose. USP 2005.
Disponível em: www.mcguido.vet.br/brucelose.htm. Acesso em: 05 jun 2013.
- [14] ALTON, G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris. **Institut National de la Recherche Agronomique**. p.545. 1988.
- [15] CROWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; CHILDERS, A.B. Value of serologic reactions following Strain 19 vaccination. **Prev. Vet. Med.** v.5, p. 275-280, 1988.
- [16] BATHKE, W. Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsioses, micoplasmose. São Paulo. Ed. Roca, v.2, p.144-160, 1988.
- [17] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. Comitê Misto FSO/OMS de especialistas em brucelose. Genebra, p.149. 1986.
- [18] RICHEY, E.J.; DIX HARREL, C. *Brucella abortus* Disease (Brucellosis) in Beef Cattle. Department of Large Animal Clinical Sciences, **College of Veterinary Medicine**, Florida. 1997
- [19] MACDIARMID, S.C. Bovine brucellosis eradication and surveillance strategies in pastoral dairy and beef cattle production. Wellington: National Adviser (Animal Health), **Ministry of Agriculture and Fisheries**, 1999.
- [20] BRASIL. Ministério da Agricultura - Exportação.
Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acessado em: 21 maio 2013.
- [21] CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA) - ESALQ/USP, 2006. Relatório Final - Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Piracicaba. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalos_completo.pdf. Acessado em: 22 maio 2013.
- [22] Revista Rural. Vacinas - Os bons resultados da pecuária fazem mercado de saúde animal se fortalecer. **Revista Rural**. Revisão 169, 2012.
Disponível em: http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2012/Artigos/rev169_vacinas.htm.
Acessado em: 21 maio 2013.
- [23] MOLLANIA, N.; KHAJEH, K.; RANJBAR, B.; RASHNO, F.; AKBARI, N.; FATHIROUDSARI, M. An efficient in vitro refolding of recombinant bacterial laccase in *Escherichia coli*. **Enzyme Microb Technol.**, v.52, p.325-30, 2013.
- [24] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). PPM 2011: rebanho bovino cresce 1,6% e chega a 212,8 milhões de cabeças.
Disponível em:
<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2241>.
Acesso em: 21 maio 2013.
- [25] MAPA. Boletim Técnico – Biotecnologia Agropecuária.
Disponível em:
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Qualidade%20dos%20alimentos/biotecnologia_F.pdf. Acesso em: 22 maio 2013.

- [26] EMBRAPA. Cavalcante, F.A. Instruções Técnicas – Brucelose, diagnóstico e controle. Disponível em: <http://catuaba.cpaefac.embrapa.br/pdf/it26.pdf>. Acesso em: 05 junho 2013.
- [27] GOVERNO BRASILEIRO. Brasil tem segundo maior rebanho de bovinos. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2010/11/24/brasil-tem-segundo-maior-rebanho-de-bovinos>. Acesso em: 27 maio 2013.
- [28] RACINE. Vacinas para uso veterinário - Sérgio Luiz de Freitas Balsamão. Disponível em: http://www.racine.com.br/index.php?option=com_k2&view=item&id=694:vacinas-para-uso-veterin%C3%A1rio-produzindo-qualidade&Itemid=109&tmpl=component&print=1. Acessado em: 22 maio 2013.
- [29] BNDES Setorial 32. Reis, C.; Pieroni, J.; Souza, J. Biotecnologia para saúde no Brasil. p.193-230. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecim ento/bnset/set32106.pdf. Acessado em: 22 maio 2013.
- [30] DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C.S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estud. av.**, São Paulo, v.24, n.70. 2010.
- [31] FUNDAÇÃO BIOMINAS. Estudo das Empresas de Biotecnologia do Brasil, 2007. Disponível em: biominas.org.br/down_actions.php?acao=1&codigo=18. Acesso em: 22 out 2012.
- [32] LAWINSKY, M.L.J.; OHARA, P.M.; ELKHOURY, M.R. Estado da arte da brucelose em humanos. **Rev Pan-Amaz Saúde**, n.4, p.75-84. 2010.
- [33] SILVA, R.V.; FEIJÓ, F.M.C.; LIMA, P.M.; SAKAMOTO, S.M. Prevalência de Brucelose Bovina no Município de Patu. Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**. v.17, n.2, p;107-112, 2007.
- [34] TOLEDO, K.A. Brucelose Bovina. Brasília, Monografia. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” em Produção e Reprodução de Bovinos. Universidade Castelo Branco. 2006.
- [35] MAQUART, M. ET AL. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. BMC. **Microbiology**, Nouzilly. p.1-11, 2009.
- [36] PAULIS, L.M. Brucelose. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo. v.70, n.2, p.239-249, 2003.
- [37] CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.195-215
- [38] BEER, J. **Doenças Infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca. 1999. p.163-178.
- [39] FERREIRA, A.J.; FERREIRA, C. **Doenças infecto-contagiosas dos animais doméstico**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. p.125-143.
- [40] Boletim de Defesa Sanitária Animal. Brasília, v.22, n.1/4, 1988.

- [41] PAULIN, L.M; FERREIRA NETO, J.S.A. Experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo. ,v.68, n.2, p.105-112, 2002.
- [42] BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Texas: University Press, College Station., p.1053-1066. 1994.
- [43] CARMICHAEL, L.E. Abortion in two hundred beagles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 1966.
- [44] CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: Isolation, diagnosis, transmission. **Livestock Sanit. Assoc**, 1968.
- [45] HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.191-195. 2003.
- [46] PACHECO, W.A. Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo. Dissertação. USP, 2007.
- Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis. Acesso em: 05 junho 2013.
- [47] BAILEY, J.W. **Manual veterinário para criadores de gado**. 5.ed.São Paulo. Organização Andrei, 1987. p.311-321.
- [48] PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIRA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. Artigo de Revisão. **Medicina Interna**. v.10, n.2, 2003.
- [49] THE UGA COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE – Department of Pathology. The University of Georgia. Incidência – *Brucella*.
- Disponível em:
<http://www.vet.uga.edu/vpp/archives/nsep/Brazil2002/brucella/Port/incidence.htm>. Acessado em: 04 nov 12.
- [50] FERREIRA NETO, S. J. Situação Epidemiológica da Brucelose Bovina no Brasil: Bases para as Intervenções. **Universidade de São Paulo**.
- Disponível em: www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/7669/5442. Acessado em: 04 nov 12.
- [51] THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *BRUCELLA*. IN: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p.236-247. 1993.
- [52] LAGE, A.P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.202-212, 2008.
- [53] GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet Microbiol**, v.90, p.281-297, 2002.
- [54] EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. **Vet Bull**, v.62, p.743-775, 1992.
- [55] SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. Patogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.16, p.95-101, 1993.

- [56] NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances Veterinary Science Comparative Medicine.**, v.24, p.69-98, 1980.
- [57] CRAWFORD, R.P.; HUBER, J.D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, p.131-151. 1990.
- [58] CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 4 ed. Philadelphia: Editora Baltimore: Willians & Wilkins, p.196-201. 1991.
- [59] GRASSO-PAULIN, L.M.S. O combate à brucelose bovina. 2000. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [60] TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. London. **Comstock Publishing Associates**, p.135-144. 1988.
- [61] CORBEL, M.J.; ELBERG, S.S.; COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva. WHO Press, p.89. 2006.
- [62] COSTA, M. Brucelose bovina e equina. In: CORRÊA, F.R; SCHAILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C. *Doença de ruminantes e equinos*. Local: Ed. Universitária UFPel, p.651. 1998.
- [63] OIE WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Comité Misto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. *Brucelosis bovina, ovina y caprina*. **Office International des Épizooties**. v.6, p.282, 1987.
- [64] POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n.1-4, p.55-62, 2002.
- [65] WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2006. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.11.3.htm. Acesso em: 03 nov 2012.
- [66] SIEGMUND, O.H.; EATON, L.G. *El Manual Merck de veterinaria: un manual de diagnostico y terapeutica para el veterinario*. **Rahway, Merck**, ed.1, 1981.
- [67] SUTHERLAND, S.S.; MACKENZIE, R.M. Applied serology in the latter stages of the eradication of bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**. v.60, p.240–242, 1983.
- [68] RIVERS, R.; ANDREWS, E.; GONZÁLEZ-SMITH, A.; DONOSO, G.; OÑATE, A. Revisión Bibliográfica - *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. **Arch. Med. Vet.**, v.38, n.1, p.7-18. 2006.
- [69] KO, J.; SPLITTER, G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clin Microbiol**, Rev 16, p.65-78, 2003.
- [70] GOLDING, B.; SCOTT, D.; SCHARF, O.; HUANG, L.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes Infect**, v.3, p.43-48, 2001.
- [71] OLIVEIRA, S.; SOEURT, N.; SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Vet Microbiol**, v.90, p.417-424, 2002.

- [72] FORESTIER, C.; DELEUIL, F.; LAPAQUE, N.; MORENO, E.; GORVEL, J. *BRUCELLA abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. **J Immunol**, v.165, p.5202-5210. 2000.
- [73] MURPHY, E.; ROBERTSON, G.; PARENT, M.; HAGIUS, S.; ROOP II, R.; ELZER, P.; BALDWIN, C. MAJOR histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.33, p.191-200, 2002.
- [74] WILKINSON, P.; Leukocyte locomotion and chemotaxis: effects of bacteria and viruses. **Rev Infect Dis**, v.2, p.293-318, 1980.
- [75] BIRMINGHAM, J.; TABATABAI, L.; DEYOE, B.; JESKA, E.; NUESSEN, M. Generation of chemotactic factor for granulocytes and monocytes from serum by fractions of *Brucella abortus*. **Immunology**. v.46, p.17-22, 1982.
- [76] YOUNG, E.; BORCHERT, J.; KREUTZER, F.; MUSER, D. Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Infect Dis**, v.151, p.682-690, 1985.
- [77] CANNING, P.; ROTH, J.; TABATABAI, L.; DEYOE, B. Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. **J Infect Dis**, v.152, p.913-921. 1985.
- [78] FERNÁNDEZ, D.; BALDWIN, C. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. **Infect Immun**, v.63, p.1130-1133, 1995.
- [79] BENNETT, J.C. Cecil - Tratado de Medicina Interna. **Guanabara Koogan**, ed.23. 2009.
- [80] EISENSCHENK, F.; HOULE, J.; HOFFMANN, E. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. **Vet Microbiol**, v.68, p.235-44, 1999.
- [81] OLIVEIRA, S.; HARMS, J.; BANAI, M.; SPLITTER, G. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella* vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. **Cell Immunol**, v.172, p.262-268, 1996.
- [82] OÑATE, A.; ANDREWS, E.; BELTRAN, A.; ELLER, G.; SCHURIG, G.; FOLCH, H. Frequent exposure of mice to crude *Brucella abortus* proteins down-regulates immune response. **Journal Vet Med**, v.47, p.677-682. 2000.
- [83] VELIKOVSKY, C. A.; CASSATARO, J.; SANCHEZ, M.; FAINBOIM, L.; FOSSATI, C.A.; SPITZ, M. Single-shot plasmid DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. Persistent expression of DNA. **J. Immunol. Methods**, v.244, p.01-07, 2000.
- [84] TABATABAI, L.; HENNAGER, S. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have antibodies to *B. abortus* Cu-Zn superoxide dismutase. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.1, p.506- 510, 1994.
- [85] CORBEIL, L.; BLAU, K.; INZANA, T.; NIELSEN, K.; JACOBSON, R.; CORBEIL, R.; WINTER, A. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. **Infect Immun.**, v.56, p.3251-3261, 1988.

- [86] GOLDING, B.; SCOTT, D.; SCHARF, O.; HUANG, L.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes Infect**, v.3, p.43-48, 2001.
- [87] SCHARF O.; AGRANOVICH, I.; LEE, K.; ELLER, N.; LEVY, L.; INMAN, J.; SCOTT, D.; GOLDING, B. Ontogeny of Th1 memory responses against a *Brucella abortus* conjugate. **Infect Immun**, v.69, p.5417-5422, 2001.
- [88] BAE J.; SCHURING, G.; TOTH, T. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins use of vaculo virus recombinant-expressing whole insects cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. **Vet Microbiol**, v.88, p.189- 202, 2002.
- [89] WYCKOFF III, J. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. **Vet Microbiol**, v.90, p395-415, 2002.
- [90] ZHAN, Y.; KELSO, A.; CHEERS, C. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenis extracts. **Infect Immun**, v.63, p.969-975, 1995.
- [91] OLIVEIRA S., SOEURT, N., SPLITTER, G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. **Vet Microbiol**. v.90, p.417-424, 2002.
- [92] DIELI, F.; POCCIA, F.; LIPP, M.; SIRECI, G.; CACCAMO, N.; DI SANO, C.; SALERNO, A. Differentiation of effector/memory Vd2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. **J Exp Med**. v.198, p.391-397, 2003.
- [93] GIAMBARTOLOMEI, G.; DELPINO, M.; CAHANOVICH, M.; WALLACH, J.; BALDE, P.; VELIKOVSKY, C.; FOSSATI, C. Diminished production of T helper 1 cytoquines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. **J Infect Dis**, v.186, p.252-259, 2002.
- [94] BALDWIN, C.; SATHIYASEELAN, T.; NAIMAN, B.; WHITE, A.; BROWN, R.; BLUMERMAN, S.; ROGERS, A.; BLACK, S. Activation of bovine peripheral blood $\gamma\delta$ T cells for cell division and IFN- γ production. **Vet Immunol Immunopathol**, v.87, p.251- 259. 2002.
- [95] SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S.; CAREY, M.; MILLER, C.; KO, J.; COVERT, J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. **Vet Immunol Immunopathol**, v.54, p.309- 319, 1996.
- [96] PASQUALI, P.; ADONE, R.; GASBARRE, L.; PISTOIA, C.; CIUCHINI, F. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. **Infect Immun**, v.69, p.6541-6544, 2001.
- [97] FERNÁNDEZ, D.; BENSON, R.; BALDWIN, C. Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. **Infect Immun**, v.63, p.4029-4033, 1995.
- [98] MATHIAS, L.A.; CHAVES, L.F.; CHEN, A.A.; GIRIO, R.J.S.; NETO, W.V. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.4, p.139-142, 2001.

- [99] CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e Regulador da Transcrição Gênica Via Fator de Transcrição NFκB. **Revista da Biologia**. v.4, 2010.
Disponível em: www.ib.usp.br/revista. Acesso em: 12 jun 2013.
- [100] MANDELL, G.; BENNET, J.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. **Churchill Livingstone**. Philadelphia, USA. ed.4, v.2, p.2053-2057, 1995.
- [101] CORBEL, M. BRUCELLOSIS: an overview. **Emerg Infect Dis**, v.3, p.213-221, 1997.
- [102] ALLEN, C.; ADAMS, L.; FITCH, T. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. **Infect Immun**, v.66, p.1008-1016, 1998.
- [103] CAROFF, M.; BUNDLE, D.; PERRY, M.; CHERWONOGRODZKY, J.; DUNCAN, J. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. **Infect Immun**, v.46, p.384-88, 1984.
- [104] HONG, P.; TSOLIS, R.; FICHT, T. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. **Infect Immun**, v.68, p.4102-4107, 2000.
- [105] CLOECKAERT, A.; VIZCAINO, N.; PAQUET, J.; BOWDEN, R.; ELZER, P. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. **Vet Microbiol**, v.90, p.229-247, 2002.
- [106] VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; BUCCOLO, L.; BOYLE, S.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change rough phenotype and attenuation. **Infect Immun**, v.68, p.3927- 3932, 2000.
- [107] MONTARAZ, J.; WINTER, A.; HUNTER, D.; SOWA, D.; WU, A.; ADAMS, L. Protection against *Brucella abortus* in mice with O polysaccharide- specific monoclonal antibodies. **Infect Immun**, v.51, p.961-963, 1986.
- [108] ARÉSTEGUI, M.; GUALTIERI, C.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Vet Méx**, v.32, p.131-139, 2001.
- [109] PONTOW, S.; KERY, V.; STAHL, D. Mannose receptor. **Int Rev Cytol**, v.139, p.221-224, 1992.
- [110] FOLCH H., OÑATE, A. Propiedades mitogénicas y caracterización de diferentes fracciones polisacáridas obtenidas de dos especies de *Brucella*. **Arch Med Vet**. v.27, p.85-92, 1995.
- [111] CARON, E.; PEYRARD, T.; KOHLER, S. LIVE *Brucella spp.* fail to induce tumour necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. **Infect Immun**, v.62, p.5267-5274, 1994.
- [112] BAE, J. Generation of baculovirus - *Brucella abortus* heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and *B. abortus* superoxide dismutase and L7/L12 recombinant proteins. Ph.D thesis. **Virginia Polytechnic Institute and State University**, Blacksburg, Virginia, USA. 1999.
- [113] VERSTREATE, D.; CREASY, M.; CAVENEY, N.; BALDWIN, C.; BLAB, M.; WINTER, A. OUTER membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. **Infect Immun**, v.35, p.979-989, 1982.

- [114] SANTOS, J.; VERSTREATE, D.; PERERA, V.; WINTER, A. Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. **Infect Immun**, v.46, p.188-194, 1984.
- [115] DOUGLAS, J.; ROSENBERG, E.; NIKAIIDO, H.; VERSTREATE, D.; WINTER, A. Porins of *Brucella* species. **Infect Immun**, v.44, p.16-21, 1984.
- [116] VERSTREATE, D.; WINTER, A. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. **Infect Immun**, v.46, p.182-187, 1984.
- [117] FICHT, T.; BEARDEN, S.; SOWA, B.; ADAMS, G. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. **Infect Immun**, v.57, p.3281-3291, 1989.
- [118] OÑATE, A.A.; CÉSPEDES, S.; CABRERA, A.; RIVERS, R.; GONZÁLEZ, A.; MUÑOZ, C.; FOLCH, H.; ANDREWS, E. A DNA Vaccine Encoding Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. **Infect. Immun.** v.71, n.9, p.4857-4861, 2003.
- [119] Oñate, A.A.; Donoso, G.; Moraga-Cid, G.; Folch, H. Céspedes, S.; Andrews E. An RNA vaccine based on recombinant Semliki Forest virus particles expressing the Cu,Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Infect Immun.** v.73, p.3294-3300, 2005.
- [120] DE COLIBUS, L.; MATTEVI, A. New frontiers in structural flavoenzymology. Current Opinion in Structural Biology. **Elsevier**. v.16, p.722–728, 2006.
- [121] SMERDOU, C.; LILJESTRÖM, P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. **J Virol**, v.73, p.1092-1098, 1999.
- [122] PAKZAD, I.; REZAEI, A.; EMANEINI, M.; HOSSEINI, A. Z.; TABBARAEI, B.; TAHERIKALANI, M. Expression on Serum Albumin – L7/L12 (*Brucella abortus* Ribosomal Protein) Fusion Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Polish Journal of Microbiology**. v.58, n.2, p.99-104, 2009.
- [123] ROOP, II R.; FLETCHER, T.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S.; SCHURIG, G. Identification of an immune reactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. **Infect Immun**, v.62, p.1000-1007, 1994.
- [124] ELZER, P.; PHILIPS, R.; ROBERTSON, G.; ROOP II, R. The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. **Infect Immun**, v.64, p.4838-4841, 1996.
- [125] ALLARDENT-SERVENT, A.; BOURG, G.; RAMUZ, M.; PAGES, M.; BELLIS, M.; ROIZES, G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. **J Bacteriol**, v.170, p.4603-4607, 1988.
- [126] JUMAS-BILAK, E.; MICHAUS-CHARACHON, S.; BOURG, G.; O'CALLAGHAN, D. RAMUZ, M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. **Molecular Microbiology**, v. 27, n.1, p.99-106, 1998.
- [127] MORENO, E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.22, p.255-275, 1998.

[128] MICHAUX-CHARACHON, S.; JUMAS-BILAK, E.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOURG, G.; BOSCHIROLI, M. L.; RAMUZ, M.; O'CALLAGHAN, D. The *Brucella* genome at the beginning of the post-genomic era. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.581-585, 2002.

[129] BENDER, P. Tipificação Molecular de Amostras de *Brucella spp.* Utilizando a Técnica de BOX-PCR. Dissertação de Mestrado. UFRGS. 2003.

Disponível em:

<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/5365/000469392.pdf?sequence=1>. Acessado em: 18 junho 13.

[130] MEYER M. The epizootiology of brucellosis and its relationship to the identification of *Brucella* organisms. **Am J Vet Res**, v.25, p.553-557, 1964.

[131] VERGER, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.; GRAYON, M. *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **Int J Syst Bacteriol**, v.35, p.292-295, 1985.

[132] HALLING, S.; PETERSON-BURCH, B.; BRICKER, B.; ZUERNER, R.; QING, Z.; LI, L.; KAPUR, V.; ALT, D.; OLSEN, S. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genome of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **J Bacteriology**, v.187, p.2715-2726, 2005.

[133] AGÊNCIA DE INFORMAÇÃO EMBRAPA. Ovinos e Caprinos: Brucelose.

Disponível em:

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000g4fuilaq02wx5ok0iuqaqkgpwf6pd.html. Acessado em: 30 dez 2012.

[134] BRIONES, G.; IÑON DE IANNINO, N.; ROSET, M.; VIGLIOCCO, A.; SILVA, P.; UGALDE, R. *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. **Infect Immun**, v.69, p.4528-4535, 2001.

[135] SCHURIG, C.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Vet Microbiol**, v.90, p.479- 496, 2002.

[136] WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION.WHO The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting with the participation of the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) and the Office International des Epizooties (OIE).. Geneva, p.11-12. 1997.

[137] OLSEN, S. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. **Res Vet Sci**, v.69, p.135-140. 2000.

[138] Scientific Committee On Animal Health And Animal Welfare: European Commission. Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*).

Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out59_en.pdf. Acesso em: 30 dez 2012

[139] Vallée. Manual Técnico – Brucelina Amostra RB51.

Disponível em:

[http://www.camposecarrer.com.br/artigos/MANUAL%20T%C3%89CNICO%20BRUCELINA%20RB51\[1\].pdf](http://www.camposecarrer.com.br/artigos/MANUAL%20T%C3%89CNICO%20BRUCELINA%20RB51[1].pdf). Acessado em: 31 dez 2012.

[140] LUNDBLAD, R.L.; MACDONALD, F. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition. CRC Press, 2010.

- [141] MCEWEN, A.D.; PRIESTLEY, F.W. Experiment on contagious abortion. Immunization studies with vaccines of graded virulence. **Veterinary Record**, v.50, p.1097-1106, 1938.
- [142] OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F.; BRICKER, B. Informe técnico sobre la vacunación del ganado con la cepa RB51 de *Brucella abortus*, 1999.
Disponível em: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/18-informe_vacunacion_brucela_cepa_rb51.pdf. Acessado em: 18 junho 13.
- [143] POESTER, F.P.; RAMOS, E.T.; GOMES, M.J.P. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.1, 2000.
- [144] SAMARTINO, L.E.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R. Evalution de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en hembras bovinas preñadas. **Jornada de Actualización sobre Brucelosis Bovina**, Rocha, 2003.
- [145] VEMULAPALLI, R.; CRAVERO, S.; CALVERT, C.; TOTH, T.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S.; ROSSETI, O.; SCHURIG, G. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.7, p.114-118, 2000.
- [146] AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; MERTENS, P.; BOLLE, X.; MICHEL, P.; GODFROID, J.; WALRAVENS, K.; LETESSON, J. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. **Infect Immun**, v.69, p.4816-4822, 2001.
- [147] DONNELLY, J.; LIU, M.; ULMER, J. Antigen presentation and DNA vaccines. **Amer J Resp Crit Care Med**, v.162, p.190-193, 2000.
- [148] TANG, D.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v.356, p.152-154, 1992.
- [149] GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.; SEDER, R. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Ann Rev Immunol**, v.18, p.927-974, 2000.
- [150] MUÑOZ-MONTESINO, C.; ANDREWS, E.; RIVERS, R.; GONZÁLEZ-SMITH, A.; MORAGA-CID, G.; FOLCH, H.; CÉSPEDES, S.; OÑATE, A. Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4+ and CD8+ T cells. **Infect Immun**, v.72, p.2081-2087, 2004.
- [151] ANDERSSON, C.; VASCONCELOS, N.; SIEVERTZON, M.; HADDAD, D.; LILJEQVIST, S.; BERGLUND, P.; LILJESTRÖM, P.; AHLBORG, N.; STAHL, S.; BERZINS, K. Comparative immunization study using RNA and DNA constructs encoding a part of the *Plasmodium falciparum* antigen Pf332. **Scand J Immunol**, v.54, p.117-24, 2001.
- [152] FLEETON, M.; SHEAHAN, B.; GOULD, E.; ATKINS, G.; LILJESTRÖM, P. Recombinant Semliki Forest virus particles encoding the prME or NS1 proteins of louping ill virus protect mice from lethal challenge. **J Gen Virol**, v.80, p.1189-1198, 1999.

- [153] WILLEMS, W.; KALUZA, G.; BOSCHEK, C.; BAUER, H.; HAGER, H.; SCHUTZ, H.; FEISTNER, H. Semliki forest virus: cause of a fatal case of human encephalitis. **Science**, v.203, p.1127-1129, 1979.
- [154] OLKKONEN, V.; LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H.; SIMONS, K.; DOTTI, C. Expression of heterologous proteins in cultured rat hippocampal neurons using the Semliki Forest virus vector. **J Neurosci Res**, v.35, p.445-451, 1993.
- [155] LUNDSTRÖM, K.; MILLS, A.; BUELL, G.; ALLET, E.; ADAMI, N.; LILJESTRÖM, P. High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. **Eur J Biochem**, v.224, p.917-21, 1994.
- [156] HELENIUS, A.; MOREIN, B.; FRIES, E.; SIMONS, K.; ROBINSON, P.; SCHIRRMACHER, V.; TERHORST, C.; STROMINGER, J. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.75, p.3846- 3850, 1978.
- [157] SINGH, I.; HELENIUS, A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. **J Virol**, v.66, p.7049-7058, 1992.
- [158] PALMER, I.; WINGFIELD, P.T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. **Curr Protoc Protein Sci**. cap.6, un.3, 2012.
- [159] MELO, E.S.P.; ARAÚJO, F.R.; RAMOS, C.A.N.; SOARES, C.O.; ROSINHA, G.M.S.; ELISEI, C.; MADRUGA, C.R. ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.27, n.7, 2007.
- [160] TAN, S.; WU, W.; LIU, J.; KONG, Y.; PU, Y.; YUAN, R. Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence. **Protein Expression and Purification**. v.25, n.3, p.430-435, 2002.
- [161] PAKZAD, I.; REZAEI, A.; RASAEI, M.J.; TABBARAEI, B.; DELPISHEH, A. Immunogenicity of HSA-L7/L12 (*Brucella abortus* ribosomal protein) in an animal model. **Iran J Immunol.**, v.6, n.1, p.12-21, 2009.
- [162] MALLICK, A.I.; SINGHA, H.; KHAN, S.; ANWAR, T.; ANSARI, M.A.; KHALID, R.; CHAUDHURI, P.; OWAIS, M. Escheriosome-mediated delivery of recombinant ribosomal L7/L12 protein confers protection against murine brucellosis. **Vaccine**, v.25, n.46, p.7873-7884, 2007a.
- [163] MALLICK, A.I.; SINGHA, H.; CHAUDHURI, P.; NADEEM, A.; KHAN, S.A.; DAR, K.A.; OWAIS, M. Liposomised recombinant ribosomal L7/L12 protein protects BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 infection. **Vaccine**, v.25, n.18, p.3692-704, 2007b.
- [164] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vaccine Excipient & Media Summary - Excipients Included in U.S. Vaccines. Vaccine. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/b/excipient-table-2.pdf>. Acesso em: 25 jun 2013.

- [165] KRIPPNER, E. Sociedade brasileira de controle de contaminação. Artigo Técnico – Classificação de Áreas Limpas. Disponível em: www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2044/42.classificacao.pdf. Acessado em: 25 mai 2013.
- [166] RAJASEKARAN, P.; SURENDRAN, N.; SELEEM, M.N.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G.G.; BOYLE, S.M. Over-expression of homologous antigens in a leucine auxotroph of *Brucella abortus* strain RB51 protects mice against a virulent *B. suis* challenge. **Vaccine**. v.29, n.17, p. 3106-3110. 2011.
- [167] VERMULAPALLI, R.; MCQUISTON, J.R.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. ,v.6, p.760-764, 1999.
- [168] SCHMIDT, F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied microbiology and biotechnology**. v.65, n.4, p.363-372, 2004.
- [169] PATRA, A.K.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN, A.; GARG, L.C.; PANDA, A. K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. **Prot. Express. Purif.**, v.18, p.182-192, 2000.
- [170] UPADHYAY, A.K.; MURMU, A.; SINGH, A.; PANDA, A.K. Kinetics of inclusion body formation and Its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. **PLoS One**., v.7, n.3, 2012.
- [171] CASH, H.L.; WHITHAM, C.V.; HOOPER, L.V. Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in *Escherichia coli*. **Prot Express Purif.**, v.48, p.151-159, 2006.
- [172] GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; KUBY, J.; OSBORNE, B.A. Immunology. 5th ed. W.H. Freeman & Co., 2003.
- [173] WYNN, T.A.; ELTOUM, I.; CHEEVER, A.W.; LEWIS, F.A.; GAUSE, W.C.; SHER, A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.** v.151, p.1430,1993.
- [174] ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. **Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia**. Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001.
- [175] MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O (Ed) . In: Imunodiagnóstico em medicina Veterinária **EMBRAPA gado de corte**. p.145-175. 2001.
- [176] DNA Cloning with Plasmid Vectors. In: LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARMELL, J. **Molecular Cell Biology**, 4.ed. New York: W. H. Freeman, 2000.

- [177] PAKZAD, I.; REZAEI, A.; RASAEI, M.J.; HOSSIENI, A.Z.; TABBARAEI, B.; KAZEMNEJAD, A. Protection of BALB/C mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with combination of recombinant human serum albumin-l7/l12 (*Brucella abortus* ribosomal protein) and lipopolysaccharide. **Roum Arch Microbiol Immunol.** ,v.69, n.1, p. 5-12. 2010.
- [178] BARROSO, L.; ABHYANKAR, M.; NOORB, Z.; READA, K.; PEDERSEN, K.; WHITE, R.; FOX, C.; PETRI JR, W.A.; LYERLY, D. Expression, purification, and evaluation of recombinant LecA as a candidate for an amebic colitis vaccine. **Vaccine**, v.13, p. 848-847. 2013.
- [179] LUO, D.; NI, B.; LI, P.; SHI, W.; ZHANG, S.; HAN, Y.; MAO, L.; HE, Y.; WU, Y.; WANG, X. Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. **J Infection and Immunity**, v. 74, n.5, p. 2734-2741. 2006.
- [180] KO, K.Y.; KIM, J.W.; HER, M.; KANG, S.I.; JUNG, S.C.; CHO, D.H.; KIM, J.Y. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. **Vet Microbiol.** v.156, p.374-380, 2012.
- [181] YANG, X.; SKYBER, J.A.; CAO, L.; CLAPP, B.; THORNBURG, T.; PACUAL, D.W. Progress in *Brucella* vaccine development. **Front Biol.** v.8, n.1, p.60-77, 2013.
- [182] VELIKOVSKY, C.A.; GOLDBAUM, F.A.; CASSATARO, J.; ESTEIN, S.; BOWDEN, R.A.; BRUNO, L.; FOSSATI, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. *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. **Infection and Immunity**, v.71, n.10, p.5750–5755, 2003.
- [183] ZHAO, Z.; LI, M.; LUO, D.; XING, L.; WU, S.; DUAN, Y.; YANG, P.; WANG, X. Protection of mice from *Brucella* infection by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of *Brucella*. **Vaccine.** v. 27, n.38, p.5214-5219, 2009.
- [184] VIEIRA, J.; MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene.** v.19, n.3, p.259–268, 1982.
- [185] YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene.** v.33, n.1, p.103-119, 1985.
- [186] BROOKS-WORRELL, B.M.; SPLITTER, G.A. Antigen of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocyte as identified by one and two dimensional cellular immunoblotting. **Infect Immun.** v.60, p.2459–2464, 1992.
- [187] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Gene. rplL 50S ribosomal protein L7/L12 [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3340091>. Acesso em: 11 ago 2013.

- [188] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Gene. ribH 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase [*Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3339926>. Acessado em: 11ago 2013.
- [189] LUO, D.; LI, PENG.; XING, L.; ZHAO, G.; SHI, W.; ZHANG, S.; WANG, X. DNA vaccine encoding L7/L12-P39 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Chinese Medical Journal**. v.119, n.4, p.331-334, 2006.
- [190] MARANHÃO, A.Q. Transformação bacteriana. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília. 2003.
- [191] GOMES, F.R. **Expressão do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli***. 2010. Tese em Biotecnologia. USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2010.
- [192] MARANHÃO, A.Q.; MORAES, L.M.P. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA. IN: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003.
- [193] NASCIMENTO, A.A.C.; ESPREÁFICO, E.M.; LARSON, M.L.P.; MONESI, N.; ROSSI, N.M.M.; RODRIGUES, V. **Apostila: Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, p.85. 1999.
- [194] MORAES, A.P. **Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus***. 2007. 143 f. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- [195] BROWN, T.A. Clonagem gênica e análise de DNA. Porto Alegre: Artmed, p.376. 2003.
- [196] SILVA, Marcelo da. Clonagem, expressão e purificação das proteínas de superfície, PsaA e fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*. 2005. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-27102005-163558/>>. Acesso em: 2013-12-13.
- [197] BLABER, M. Florida State University. Aula - Molecular Biology and Biotechnology. Curso: Prokaryotic Expression Vectors. Disponível em: <http://wine1.sb.fsu.edu/bch5425/lect25/lect25.htm>. Acesso em: 12 jul 2013.
- [198] UNGER, T.F. Show Me The money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems. **The Scientist**. v.11, n.17. 1997. Disponível em: http://www.the-scientist.com/yr1997/sept/profile2_970901.html. Acesso em: 12 jul 2013.
- [199] Socalsmithers of the Science Advisory Board. Product Reviews: Novagen pET Vector Expression System. Disponível em: <http://www.scienceboard.net/resources/prodreviews.asp?cat=9&product=339>. Acesso em: 12 jul 2013.

[200] BIOLOGY - DAVIDSON COLLEGE, Davidson, North Carolina. The pET Expression System.

Disponível em:

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Causey/pET.html>.

Acesso em: 12 jul 2013.

[201] AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, p.4755.

2003.

[202] MERCK. Como melhorar sua expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*.

Disponível em: http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/proteinas_recombinantes_1.pdf.

Acesso em: 15 jul 2013.

[203] NASCIMENTO, A.A.C.; ESPREAFICO, E.M.; LARSON, M.L.P.; MONESI, N.; ROSSI, N.M. M.; RODRIGUES, V. Tecnologia do DNA recombinante. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, p.85. 1999.

[204] GATTI-LAFRANCONI, P.; DIJKMAN, W.P.; DEVENISH, S.R.; HOLLFELDER, F. A single mutation in the core domain of the lac repressor reduces leakiness. **Microb Cell Fact.** v.12, n.1, p.67-77, 2013.

[205] BORZANI, W.; AQUARONE, E.; WILIBALDO, S. Biotecnologia Industrial. Local: Edgard Blucher Editora, 2001.

[206] NEVES, L.C.M. USP: teses. Estudo dos Métodos Mecânicos de Rompimento.

Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134. Acesso em: 01 ago 2013.

[207] BARNEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.5, p411-421. 1999.

6. ANEXOS

6.1. Anexo I

Sequência de Nucleotídeos do gene rplL

Atg gct gat ctc gca aag atc gtt gaa gac ctt tcg gcc ctg acc gtt ctg gaa gcc gct
gag ctg tcc aag ctt ctc gaa gag aag tgg ggc gtt tcg gct gct gct ccg gtc gct gtt
gct gct gcc ggt ggc gct gcc cct gct gct gcc gca gaa gaa aag acc gaa ttc gac gtc
gtt ctc gct gac ggc ggc gct aac aag atc aac gtg atc aag gaa gtg cgc gca ctc acc
ggt ctc ggc ctc aag gaa gcc aag gac ctg gtc gaa ggc gct ccg aag gct gtc aag gaa
ggc gcc tcg aag gac gaa gct gag aag atc aag gca cag ctc gaa gct gct ggc gcc aag
gtt gaa ctc aag taa

6.2. Anexo II

Sequência de Nucleotídeos do gene ribH

Atg gag ttt ctc atg tcc aag cac gag gcc gat gcg ccg cat ttg ctt att gtc gaa gcg
cgt ttc tac gat gat ctg gcc gac gcg ctt ctc gat ggc gca aag gca gcc ttg gat gag
gca ggg gca acc tac gac gtc gtg acg gtt cca ggc gcg ctg gaa att ccg gca acg att
tcc ttc gcc ctc gac ggc gcg gat aat ggc ggc acg gaa tat gac ggc ttt gtc gcg ctt
ggc act gtc att cgc ggc gag acc tat cat ttc gac atc gtg tcc aat gaa tcc tgc cgc
gcg ctt acc gat ctt tcg gtc gag gaa agc att gcc atc ggc aac ggc att cta acg gtc
gag aat gaa gag cag gca tgg gtg cac gcc cgc cgc gaa gac aag gac aag ggt ggc
ttt gca gcc cgt gcc gca ttg act atg atc ggc ctg cgc aaa aaa ttc gga gcc tga

7. DADOS FINAIS

De acordo,

Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Denise Medeiros Selegato