

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

HELOÍSA MARIA BRESSAN BRAZ

**PATOGENICIDADE DE BRUCELLA OVIS EM CAMUNDONGOS GESTANTES E
AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E PROTEÇÃO INDUZIDA PELA CEPA
MUTANTE ATENUADA *BRUCELLA OVIS* $\Delta abcBA$ DURANTE A GESTAÇÃO**

Belo Horizonte

2021

Heloísia Maria Bressan Braz

**PATOGENICIDADE DE BRUCELLA OVIS EM CAMUNDONGOS GESTANTES E
AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E PROTEÇÃO INDUZIDA PELA CEPA
MUTANTE ATENUADA *BRUCELLA OVIS* $\Delta abcBA$ DURANTE A GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal.

Orientador: Prof. Renato de Lima Santos.

Coorientadora: Profa. Tatiane Alves da Paixão

Belo Horizonte

2021

B827p

Braz, Heloísia Maria Bressan, 1996-

Patogenicidade de *Brucella ovis* em camundongos gestantes e avaliação da inocuidade e proteção induzida pela cepa mutante atenuada *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ durante a gestação/ Heloísia Maria Bressan Braz. -2021.

51 f.:il

Orientador: Renato de Lima Santos

Coorientadora: Tatiane Alves da Paixão

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Bibliografias: f. 43 – 51.

1. Ovinos - Doenças - Teses - 2. Brucelose em animais – Teses - 3. Vacina veterinária - Teses - I. Santos, Renato de Lima – II. Paixão, Tatiane Alves da - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

HELOISIA MARIA BRESSAN BRAZ

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 22 de junho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Renato de Lima Santos

Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Ana Patricia de Carvalho da Silva

Dr.(a). Alcina Vieira de Carvalho Neta

Dr.(a). Silvia de Araujo França Baêta



Documento assinado eletronicamente por **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 22/06/2021, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alcina Vieira de Carvalho Neta, Usuário Externo**, em 06/07/2021, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Patricia de Carvalho da Silva, Usuário Externo**, em 29/06/2021, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia de Araújo França Baêta, Usuário Externo**, em 23/06/2021, às 10:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0784359** e o código CRC **64754BEC**.

Dedico este trabalho a minha mãe Helaine Bressan de Mendonça e a minha avó Rita de Cássia Bressan (*in memoriam*), que além de acreditar e apoiar os meus sonhos, nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançá-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meus passos ao longo dessa trajetória, me mantendo sempre forte diante das adversidades e por todas as oportunidades e conquistas alcançadas;

A minha mãe Helaine Bressan de Mendonça, a minha avó Rita de Cássia Bressan de Mendonça (*in memorian*), a minha tia Maria de Lourdes Bressan e aos meus tios Helaine Lopes de Faria Bressan e Ivan Bressan de Mendonça por todo carinho, paciência, incentivo, preocupação, apoio e amor oferecidos a mim;

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato de Lima Santos e a minha Coorientadora profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão, pela oportunidade, pela confiança, pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos;

A todos os colegas do Laboratório de pesquisa de doenças infecciosas RLS, pela paciência e dedicação em sempre me ensinar e estender a mão, sem vocês esse projeto não seria possível.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada que foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional, Paula Correa, Marcelo Coelho, Jefferson Bruno, Fabíola Barroso, Monique, Thaynara Carvalho, Bruno Sossai, Amanda Rodrigues e Pâmela Grossi.

Ao Jhosen pelo companheirismo, paciência, carinho e ajuda durante essa fase.

Ao prof. Dr João Paulo Machado, que foi meu orientador durante a graduação e o primeiro a me incentivar e apoiar a seguir essa área.

À Escola de Veterinária da UFMG, por proporcionar um ensino de grande qualidade e pelo acolhimento durante esse período; A Capes, pela bolsa concedida. E a todos que de algum modo, me incentivaram e me acompanharam nessa jornada, meu sincero agradecimento.

Obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito” (Charles Chaplin)

RESUMO

A brucelose ovina causada por *Brucella ovis* é uma das principais enfermidades que cursam com falhas reprodutivas em ovinos. Considerando a escassez de pesquisas relacionadas à infecção por *Brucella* em modelo murino gestante, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a patogenicidade transplacentária da cepa virulenta de *B. ovis* ATCC 25840 (*B. ovis* WT) e *B. ovis* $\Delta abcBA$, bem como avaliar o potencial vacinal da cepa mutante de *B. ovis* $\Delta abcBA$ nesse mesmo modelo. Para isso, 40 camundongos fêmeas BALB/c foram divididas em quatro grupos contendo 10 animais cada: Grupo 1 – inoculado com solução salina (PBS), grupo 2 – inoculado com PBS e desafiado com *B. ovis* WT; grupo 3 – inoculado com PBS e desafiado com *B. ovis* $\Delta abcBA$; grupo 4 vacinado com *B. ovis* $\Delta abcBA$ e desafiado com *B. ovis* WT. As fêmeas foram estimuladas ao estro e colocadas para cópula. Cinco dias após a visualização do *plug* vaginal foram inoculadas intraperitonealmente (ip) com 100 μ L de PBS estéril, 100 μ L de 1×10^6 UFC de *B. ovis* $\Delta abcBA$ e 100 μ L de 1×10^6 UFC de *B. ovis* WT, conforme estabelecido nos grupos supracitados. Ao décimo sétimo dia de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas e necropsiadas para coleta de fragmentos de baço, fígado, útero, placenta, feto e glândula mamária para bacteriologia, histopatologia e imunoistoquímica. Nas fêmeas inoculadas com a estirpe selvagem observaram-se placentite necrotizante, além de microgranulomas em fígado e baço. Com base nesses resultados é possível avaliar que a infecção por *B. ovis* em modelo murino gestante tem comportamento similar à infecção por *B. abortus* no mesmo modelo. A cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ além de não resultar em recuperação bacteriana em nenhum dos órgãos supracitados, também não induziu lesões macroscópicas e histopatológicas, demonstrando ser esta uma cepa segura e atenuada nesse modelo de estudo experimental. Além disso, *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi capaz de produzir resposta imunológica protetora após o desafio com *B. ovis* WT.

Palavras-chave: Patogenicidade transplacentária, vacina, *Brucella ovis*, placentite necrotizante.

ABSTRACT

Ovine brucellosis caused by *Brucella ovis* is one of the most important diseases causing reproductive failure in sheep. Considering the scarcity of research related to *Brucella* infection in a pregnant murine model, this study was developed with the goal of evaluating the transplacental pathogenicity of *B. ovis* virulent strain ATCC 25840 (*B. ovis* WT) and *B. ovis* $\Delta abcBA$ associated with the vaccine potential of mutant strain of *B. ovis* $\Delta abcBA$ in this same model. Thus, 40 BALB/c female mice were divided into four groups containing 10 animals each: Group 1 – inoculated with saline solution (PBS); group 2 – inoculated with PBS and challenged with *B. ovis* WT; group 3 – inoculated with PBS and challenged with *B. ovis* $\Delta abcBA$; group 4 vaccinated with *B. ovis* $\Delta abcBA$ and challenged with *B. ovis* WT. Female mice were stimulated for induction of estrus and allowed to copulate. Five days after visualization of the vaginal plug, they were inoculated intraperitoneally (ip) with 100 μ L of sterile PBS, 100 μ L of 1×10^6 CFU of *B. ovis* $\Delta abcBA$ and 100 μ L of 1×10^6 CFU of *B. ovis* WT as established in the aforementioned groups. They were euthanized and necropsied. On the seventeenth day of gestation, the females were euthanized and necropsied to collect fragments of spleen, liver, uterus, placenta, fetus and mammary gland for bacteriology, histopathology and immunohistochemistry. Females inoculated with the WT strain developed necrotizing placentitis as well as microgranulomas in the liver and spleen. Therefore, *B. ovis* infection in pregnant mice results in changes similar to those previously observed in *B. abortus* infection in the same model. Infection with *B. ovis* $\Delta abcBA$ mutant strain did not result in bacterial recovery from any of the aforementioned organs, and it did not induce gross or microscopic lesions, making it a safe and attenuated strain in this experimental model. In addition, *B. ovis* $\Delta abcBA$ was able to induce a protective immune response after the challenge with *B. ovis* WT.

Keywords: Transplacental pathogenicity, vaccine, *Brucella ovis*, pregnant, necrotizing placentitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Identificação do <i>plug</i> vaginal (seta preta).	24
Figura 2 - Citologia vaginal. (A) Proestro: predomínio de células epiteliais nucleadas. (B) Estro: predomínio de células cornificadas. (C) Metaestro presença de leucócitos, células cornificadas e células epiteliais. (D) Diestro: predomínio de leucócitos.	25
Figura 3. Análise de peso para confirmação da gestação. Os camundongos foram divididos em quatro grupos PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT (n = 10 por grupo). Após a visualização do <i>plug</i> vaginal foi realizado diariamente a pesagem das fêmeas até o dia da eutanásia. Os pontos representam as fêmeas gestantes, não gestantes ou que tiveram morte fetal (indicadas por diferentes cores conforme a legenda) e as barras a média/SD.....	27
Figura 4 - A- Variação de peso das fêmeas PBS\PBS do dia da cópula até o dia da eutanásia. B- Variação de peso das fêmeas PBS/ $\Delta abcBA$ do dia da cópula até o dia da eutanásia. C- Variação de peso das fêmeas $\Delta abcBA$ /WT do dia da cópula até o dia da eutanásia (D) Variação de peso das fêmeas PBS/WT do dia da cópula até o dia da eutanásia. (n = 10 por grupo). As barras pretas representam fêmeas não gestantes, vermelhas: fêmeas gestantes, azuis: morte embrionária	28
Figura 5 - (A) Fêmea não gestante. (B) Fêmea gestante com moderada distensão abdominal.	29
Figura 6 - Comparação do útero não gestante, útero gestante e útero com mortalidade fetal do grupo PBS/WT (n = 10). (A) Útero não gestante. (B) Útero gestante. (C) Útero com reabsorção fetal (seta preta).	29
Figura 7 - Placenta do grupo PBS\WT, nota-se área circular, esbranquiçada, de consistência friável, sugestiva de necrose (seta preta).	30
Figura 8 - Peso do baço das fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: *** (P < 0.001); ns: não significativo.....	30
Figura 9 - (A) Fígado do grupo $\Delta abcBA$ /WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE 20x. (B) Fígado, do grupo PBS/ WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE. 20x. (C) Fígado do grupo $\Delta abcBA$ /WT, imunomarcção positiva para <i>B. ovis</i> (seta preta), 40x. (D) Fígado do grupo PBS/ WT, imunomarcção positiva para <i>B. ovis</i> (seta preta), 40x	31
Figura 10 - (A) Baço, grupo $\Delta abcBA$ /WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE 20x. (B) Baço, grupo PBS/WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE 20x. (C) Baço do grupo $\Delta abcBA$ /WT, imunomarcção para <i>Brucella</i> spp. (seta preta), 4 para <i>B. ovis</i> (seta preta), 40x. (D) Fígado do grupo PBS/ WT, imunomarcção positiva para <i>B. ovis</i> (seta preta), 40x	32
Figura 11 - (A) Útero, grupo $\Delta abcBA$ /WT (n = 10) a seta preta indica área acentuada de necrose e restos celulares compatíveis com morte fetal, esta área está associada ao endométrio (asterisco). HE 20x. (B) Útero, grupo PBS/WT (n = 10) a seta preta indica área acentuada de necrose e restos celulares compatível	

com reabsorção fetal, esta área está associada ao endométrio (asterisco). HE 20x. (C) Útero do grupo $\Delta abcBA/WT$ (n = 10), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta) o asterisco indica o endométrio. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 40x. (D) Útero do grupo PBS/WT (n = 10), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica o endométrio. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. 40x. 33

Figura 12 - (A) - Placenta, grupo $\Delta abcBA/WT$ (n = 10) a seta preta indica área focalmente extensa de necrose e restos celulares associada a miríade de bactérias (seta branca), esta área está localizada na decídua materna (asterisco). HE 20x. (B) Placenta, de Mayer, 20x. (D) Placenta do grupo PBS/B. ovis WT (n = 10), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica a decídua materna. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 20x. C) Placenta do grupo $\Delta abcBA/WT$ (n = 10), imunomarcção positiva para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica a decídua materna. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 40x. (D) Placenta do grupo PBS/B. ovis WT (n = 10), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica a decídua materna. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 40x 34

Figura 13 (A) Escore das alterações histopatológicas do fígado dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (* p < 0,05); (**** p < 0,0001); ns: não significativo. (B) Avaliação do escore histopatológico do baço dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (**** p < 0,0001); ns: não significativo. (C) Avaliação do escore histopatológico da placenta dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (**** p < 0,0001); ns: não significativo 35

Figura 14 - (A) Recuperação de *Brucella ovis* por grama de fígado em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (* p < 0,05); (** p < 0,01); (**** p < 0,0001). (B) Recuperação bacteriana de amostra virulenta e mutante de *B. ovis* por grama de baço em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre os grupos são indicadas por asteriscos: (**** p < 0,0001), ns: não significativo. 36

Figura 15 - (A) Recuperação de *Brucella ovis* por grama de glândula mamária em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (** p < 0,01); (**** p < 0,0001); ns: não significativo. (B) Recuperação de *B. ovis* por grama de útero em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos:

PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre os grupos são indicadas por asteriscos: (* $p < 0,01$); (** $p < 0,001$) (***) $p < 0,0001$)..... 37

Figura 16 - **(A)** Recuperação de *Brucella ovis* por grama de placenta em fêmeas gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (***) $p < 0,0001$). **(B)** Recuperação bacteriana de amostra virulenta e mutante de *B. ovis* por grama de feto dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal- Wallis. Diferenças estatísticas entre os grupos são indicadas por asteriscos: (* $p < 0,01$); (** $p < 0,001$). (***) $p < 0,0001$). 38

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: *ATP binding cassette*

APC: Células apresentadoras de antígenos

BOP-I: Ilha de patogenicidade 1 de *Brucella ovis*

CaCl₂: Cloreto de cálcio CO₂: Dióxido de carbono

DAB: Cromógeno 3'3-diaminobenzidina DNA: Ácido desoxirribonucléico

FC: Fixação de complemento HE: Hematoxilina e eosina

IDGA: Imunodifusão em gel de Agar IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12 INF- γ : Interferon gama IP: Intraperitoneal

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Log: Logaritmo

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MOPS: 3-(N-morfolino)propanesulfônico

NaCl: Cloreto de sódio

ORF: Quadro de leitura aberta

PAMPS: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Tampão fosfato

PCR: Reação de cadeia polimerase TSA: Agar triptona de soja

TLR: Receptor do tipo toll

UFC: Unidade formadora de colônia UnK: *Cell natural killer uterine* WT: *Wild type*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVO.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 O gênero <i>Brucella</i>	16
3.2 Infecção por <i>Brucella ovis</i>	17
3.3 Diagnóstico e controle de <i>Brucella ovis</i>	18
3.4 Resposta imune frente à infecção por <i>Brucella</i> spp.....	19
3.5 Sistemas transportadores do tipo ABC	20
3.6 Citologia vaginal e ciclo estral nas fêmeas de camundongo BALB/c	21
3.7 Placentação	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Cultivo da cepa virulenta de <i>Brucella ovis</i> ATCC 25840 .. Error! Bookmark not defined.	
4.2 Delineamento experimental.....	23
4.3 Histopatologia.....	25
4.4 Bacteriologia.....	26
4.5 Imunoistoquímica	26
4.6 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	27
5.1 Alterações patológicas	27
5.2 Escore histopatológico.....	35
5.3 Isolamento bacteriano	36
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa crônica causada por bactérias do gênero *Brucella*. Estas bactérias acometem animais domésticos, selvagens e o homem (FRANCO et al., 2007; CORBEL et al., 2006). As principais espécies de *Brucella* que possuem potencial patogênico para o ser humano são: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* (MORENO et al., 2002; SCHOLZ et al., 2010; KANG et al., 2019).

Nos animais domésticos, como bovinos, ovinos, caprinos e suínos, as principais conseqüências incluem alterações reprodutivas como: aborto e metrite em fêmeas, orquite e epididimite em machos, além de infertilidade e nascimento de crias fracas. No homem, a doença se destaca por ter caráter crônico e induzir sinais clínicos inespecíficos como falta de apetite, apatia, cefaléia, perda de peso, febre ondulante, podendo progredir para artrite, meningite, endocardite, espondilite, alterações reprodutivas e, em casos raros, pode acometer o sistema nervoso central e ocasionar sintomatologia nervosa (BOSCHIROLI et al., 2001; FRANCO et al., 2007). No homem sua transmissão ocorre pela ingestão de alimentos oriundos de animais contaminados, como por exemplo, leite não pasteurizado; produtos lácteos contaminados ou pelo contato direto e/ou indireto com animais infectados (ALTURI et al., 2011).

Por serem agentes potencialmente abortivos *Brucella* spp. causam perdas econômicas significativas a produtores rurais (SANTOS et al., 2013), visto que a enfermidade além de ocasionar aborto, baixa fertilidade e nascimento de crias fracas, também pode levar a produção de leite e carne insatisfatórias, perdas no rendimento industrial com a condenação de produtos oriundos de animais infectados e imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional (POESTER et al., 2009; POESTER et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

Atualmente o Brasil dispõe de duas cepas vacinais (B19 e RB51) para o controle e prevenção da brucelose bovina. A vacinação utilizando a cepa B19 é feita nas fêmeas bovinas entre três e oito meses de idade, caso a vacinação seja feita em animais superiores a essa idade induz a produção de anticorpos detectáveis nos testes de rotina empregados para diagnóstico da brucelose. Já a cepa RB51 pode ser utilizada em qualquer idade, por ser uma cepa

estavelmente rugosa, possui a vantagem de não induzir anticorpo específico anti-LPS detectados pelos testes sorológicos de rotina (SCHURIG, et al., 2002; BASTOS et al., 2012). Em caso de acidente com a manipulação desta cepa, é de suma importância a utilização alternativa de outras drogas para o tratamento sistêmico, já que, esta cepa é resistente a rifampicina (SCHURIG, et al., 2002; Brasil, 2017a; BASTOS et al., 2012).

Em suma, as vacinas vivas atenuadas disponíveis comercialmente contra *B. abortus* possuem como desvantagens: o potencial patogênico para o homem em casos de exposição acidental a vacina, interferência nos testes diagnósticos, excreção bacteriana em fluidos biológicos, além da possibilidade de indução de abortos nos animais (CORBEL et al., 2006; BASTOS et al., 2012). No momento não existe no Brasil uma vacina comercial para o controle e prevenção de *B. ovis*.

O modelo murino se tornou o principal modelo para o estudo da brucelose, apesar de apresentarem diferenças fisiológicas e imunológicas quando comparado aos hospedeiros preferenciais de cada espécie de *Brucella*, o modelo permite fácil manuseio, e requer espaços menores para a elaboração do experimento, quando comparado a modelos experimentais que utilizam animais de grande porte, como, por exemplo, bovinos (SILVA et al., 2011; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS et al., 2014). Novos estudos envolvendo esse modelo experimental estão surgindo. Byndloss et al (2019) observaram que a infecção por *B. abortus* em modelo murino gestante apesar das diferenças fisiológicas entre as espécies foi capaz de induzir lesões similares à infecção em ruminantes, tornando esse um bom modelo para estudo.

Ao longo do tempo há vários estudos em diferentes modelos experimentais que buscam o desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz e protetora contra a infecção por *Brucella*. Carvalho et al (2016) realizaram uma meta-análise dos avanços recentes em vacinologia contra brucelose no modelo murino e concluíram que ao longo de 30 anos, não houve uma tendência clara relacionada ao progresso do potencial protetor dessas vacinas experimentais, um imunógeno que fosse capaz de controlar a carga bacteriana nos animais, impedindo as perdas reprodutivas, e impedindo a excreção da bactéria, seja cepa vacinal ou selvagem, pelos fluidos biológicos, como leite, secreção vaginal, urina e placenta, seria uma importante ferramenta na erradicação da brucelose nos animais impedindo assim, sua propagação para os humanos (CARVALHO et al., 2016).

Estudos prévios feitos no Laboratório de Patologia Molecular (LPM), da Escola de Veterinária da UFMG, levaram ao desenvolvimento de uma estirpe mutante de *B. ovis* denominada $\Delta abcBA$ que resultou na atenuação *in vitro* e *in vivo* em camundongos e ovinos (SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2013), com menor colonização bacteriana no baço e no fígado, além de não induzir lesões macroscópicas e microscópicas no baço, fígado ou órgãos reprodutores.

Considerando os resultados promissores utilizando a cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ (SILVA et al., 2015) e a ausência de estudos relacionados a infecção por *B. ovis* em modelo

murino gestante, esse trabalho propõe avaliar a patogenicidade transplacentária de *B. ovis* em modelo murino gestante associado ao potencial vacinal da cepa mutante de *B. ovis* $\Delta abcBA$ nesse mesmo modelo.

2. OBJETIVO

- Avaliar o potencial patogênico da cepa mutante atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$ e *B. ovis* WT em modelo murino gestante.
- Avaliar inocuidade a proteção induzida pela cepa mutante atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$ em modelo murino gestante.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Brucella*

A brucelose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, que são cocobacilos Gram-negativos intracelulares facultativos, não esporulados e não encapsulados, capazes de infectar várias espécies animais e humanos (CORBEL et al., 2006). Um importante fator de virulência das bactérias desse gênero é o lipopolissacarídeo (LPS) presentes na membrana externa. A molécula de LPS é formada pela porção antigênica cadeia O e a porção tóxica lipídeo A. Bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae*) e as rugosas (*B. canis* e *B. ovis*). As colônias lisas possuem a molécula de LPS completa, isto é, possui tanto a porção antigênica cadeia O quanto a porção tóxica lipídeo A, já as colônias rugosas possuem a molécula de LPS incompleta, estas não apresentam o antígeno-O (MARTIN; HANCOCK, 1990; BASTOS et al., 2012).

A primeira descrição de *Brucella* ocorreu em 1887 por David Bruce, que identificou a bactéria, então denominada *Micrococcus melitensis*, como causadora da febre de Malta (GODFROID et al., 2005). Atualmente, o gênero possui seis espécies clássicas que são reconhecidas de acordo com sua patogenicidade e seus respectivos hospedeiros preferenciais: *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (cães), *B. neotomae* (roedores silvestres) e *B. ovis* (ovinos) (MORENO et al., 2002; MORENO et al., 2014; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2010; KANG et al., 2019; MORENO, 2021).

Novas espécies de *Brucella* foram identificadas, como: *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (focas), ambas patogênicas para o ser humano, além de *B. microti* (roedores silvestres) (Audic et al., 2009), *B. vulpis* (raposas) (Scholz et al., 2016), *B. papionis* (babuínos) e *B. inopinata* (isolada de implante mamário e biópsia de pulmão de humanos) (TILLER et al., 2010a; WHATMORE et al., 2014; SCHOLZ et al., 2010; KANG et al., 2019; MORENO, 2021).

3.2 Infecção por *Brucella ovis*

A *B. ovis* pertencente à família alfa2-Proteobacteriaceae, é um coco-bacilo Gram-negativo, intracelular facultativo, que causa infecção crônica clínica ou subclínica em ovinos e não possui potencial patogênico ao ser humano (TSOLIS et al., 2009; XAVIER et al., 2010; SILVA et al., 2013). Em carneiros, a enfermidade é caracterizada por induzir lesões reprodutivas concentradas especialmente no epidídimo, testículo e vesículas seminais, essas lesões estão associadas a patologias espermáticas podendo resultar em subfertilidade ou infertilidade (CARVALHO JUNIOR et al., 2010; MEGID et al., 2010), comumente associadas ao desenvolvimento de granuloma espermático. O patógeno causa um processo inflamatório neutrofílico associado à degeneração cística do epitélio dos túbulos epididimários; isso faz com que ocorra a estase espermática seguida do rompimento do túbulo e extravasamento de espermatozóides para o interstício (CARVALHO JÚNIOR et al., 2012). Nas fêmeas, *B. ovis* induz quadros de cervicite e endometrite, podendo ou não estar associada a casos raros de aborto (MUHAMMED et al., 1975; HOMES et al., 1994).

A brucelose em ovinos pode se manifestar de forma aguda ou crônica. A forma aguda em machos é caracterizada pelo aumento dos testículos associado a edema e a presença de exsudato fibrinoso entre a túnica vaginal e albugínea (MEGID et al., 2010). Na fase crônica há o surgimento de regiões hipertrofiadas e endurecidas à palpação testicular, deformações na cauda do epidídimo, a bolsa escrotal pode apresentar aderências fibrosas que obstruem a cavidade que separa as túnicas. A principal forma de transmissão da doença é a venérea, através da mucosa vaginal, prepucial e sêmen infectado (NOGUEIRA et al., 2006).

Com o crescimento significativo da ovinocultura brasileira, a infecção por *B. ovis* se tornou cada vez mais frequente nas propriedades ruarais. Em 2019, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontou que o Brasil contabilizou 20 milhões de cabeças ovinas. No Brasil, *B. ovis* foi diagnosticada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1966). Posteriormente, foram surgindo outros estudos indicando a ocorrência da doença nos

diferentes estados. No Sergipe foi realizado um estudo epidemiológico em 54 propriedades criadoras de ovinos, 46,30% apresentaram soroconversão para *B. ovis* (MENDONÇA et al., 2017). No Piauí, 53,6% das propriedades investigadas apresentaram pelo menos um caso de ovino soropositivo para *B. ovis*, em 28,6% das propriedades foi relatada a ocorrência de abortos (TEIXEIRA et al., 2020). Nos municípios de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) 6,5% das propriedades avaliadas apresentaram soroconversão para *B. ovis* (Peixoto et al. 2016); no estado de São Paulo observou-se a ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em 12% dos ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos (RIZZO et al. 2014).

As medidas de controle e prevenção estão associadas à combinação de exames clínicos e andrológicos, antes e depois da estação de monta ou na época da reprodução. Animais com lesões clínicas ou positivas em testes laboratoriais devem ser descartados do rebanho (MARQUES, 2006; BASTOS et al., 2012). É válido ressaltar que não existe vacina específica para *B. ovis*. A vacina Rev 1 utilizada para o controle de *B. melitensis* exibe proteção cruzada para *B. ovis*, entretanto tal vacina não pode ser utilizada em regiões geográficas livres de *B. melitensis*, como é o caso do Brasil. Por esse motivo a ausência de uma vacina eficaz e disponível comercialmente no Brasil constitui um importante fator limitante para o amplo controle da doença nos rebanhos ovinos.

Para a vacinação contra brucelose ovina e caprina, alguns países utilizam a cepa vacinal Rev 1, caracterizada por ser uma cepa viva atenuada de *B. melitensis*, resistente à estreptomicina. Além de não ser liberada para vacinação de pequenos ruminantes em países onde a *B. melitensis* é exótica, a vacina possui algumas desvantagens como a interferência no diagnóstico sorológico de brucelose, uma vez que induz produção de anticorpos contra o LPS; e por se tratar de uma vacina viva atenuada pode causar infecção humana em casos de exposições acidentais a vacina; induz aborto em ruminantes e é resistente à estreptomicina, antibiótico este utilizado no tratamento de brucelose em humanos (BLASCO, 1997; GRILLÓ et al., 2000, MENDONÇA et al., 2017, BASTOS et al., 2012).

3.3 Diagnóstico e controle de *Brucella ovis*

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* baseia-se na avaliação clínica do animal associada a exames laboratoriais com coletas sucessivas de sangue para obtenção de soro e identificação direta do agente através de isolamento bacteriano ou detecção de DNA pela técnica de reação de cadeia polimerase (PCR) de animais suspeitos (BASTOS et al., 2012).

Os testes sorológicos são de extrema importância para o diagnóstico da brucelose (MOL

et al., 2012). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), preconiza o diagnóstico da *B. ovis*, por meio do teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), método que utiliza antígenos de parede celular ou citoplasmáticos para detecção de anticorpos anti-*B. ovis* (BLASCO, 1990; MYERS; SINIUK, 1970). O teste fixação de complemento (FC), considerado bastante específico para detecção de *B. ovis*, entretanto sua execução é complexa e necessita da inativação do soro pelo calor, além da atividade anticomplementar de algumas amostras (SANTOS et al., 2005; CLAPP, 1955). O ELISA indireto é um teste imunoenzimático sensível e específico (XAVIER et al., 2011).

3.4 Resposta imune frente à infecção por *Brucella* spp.

Após a infecção do hospedeiro, as bactérias são internalizadas e direcionadas aos linfonodos regionais, onde são fagocitadas. Dentro dos fagócitos a bactéria inibe a fusão com os lisossomos impedindo a atividade bactericida do hospedeiro, e em seguida inicia sua multiplicação no interior da célula (ALTURI et al., 2011).

A resposta protetora para o controle da infecção por *Brucella* spp. Baseia-se na secreção de INF- γ por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, além da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (GOLDING et al., 2001). Resumidamente, após o contato prévio com a bactéria, as células apresentadoras de antígenos (APC) do hospedeiro reconhecem moléculas específicas do agente infectantes denominadas PAMP (Padrões Moleculares Associados ao Patógeno), por meio dos receptores do tipo Toll (TLR). Em seguida, macrófagos e células dendríticas iniciam a secreção de IL-12 e INF- γ . A síntese de IL-12 estimula a diferenciação de células Th0 em Th1 secretando ainda mais INF- γ , que por sua vez promove a ativação de macrófagos, e a eliminação das bactérias intracelulares mediadas por oxigênio e nitrogênio reativo (DIACOVICH; GORVEL, 2010). A modulação da secreção destas citocinas pró-inflamatórias acontece em especial por IL-10. Xavier et al (2013) obtiveram resultados que sugerem que a produção precoce de IL-10 por células T CD25⁺ T CD4⁺ modula a função dos macrófagos e contribui para um equilíbrio inicial entre citocinas pró- inflamatórias e anti-inflamatórias que são benéficas para o patógeno, promovendo assim maior sobrevivência bacteriana e persistente infecção. Portanto, a produção de IL-10 por células T promove infecção crônica, tornando os macrófagos células alvo para a replicação intracelular da bactéria. (JIANG; BALDWIN, 1993; XAVIER et al., 2013).

Portanto, a eliminação da bactéria é estabelecida pela interação de células T e da

secreção de diferentes citocinas com predomínio da resposta do tipo Th1 (DORNELES et al., 2015). Por esse motivo, vacinas que atuam estimulando a resposta imune celular do tipo Th1 têm ganhado grande destaque no mercado frente ao combate à infecção por bactérias intracelulares. Várias metodologias são empregadas com essa finalidade, dentre elas incluem-se a utilização de vetores como vírus e DNA de plasmídeo, patógenos vivos atenuados ou a utilização de adjuvantes (GRIFFITHS; KHADER, 2014). Carvalho et al (2016), fizeram uma meta análise utilizando as diferentes metodologias que empregam o modelo murino de estudo para avaliar se os índices de proteção têm melhorado ao longo do tempo, um total de 117 publicações com 782 individuais foram analisados, durante o estudo foi observado que as vacinas atenuadas (n = 221), inativadas (n = 66) e mutantes (n = 102) forneceram um índice de proteção médio acima de log 2, enquanto as subunidades (n = 287), DNA (n = 68) e vetorizadas (n = 38) proporcionaram índices de proteção inferiores a log 2. esses resultados indicaram que não houve uma tendência clara para melhorar o potencial protetor dessas vacinas experimentais. Carvalho et al. (2020) também realizaram meta-análise dos modelos de vacinas experimentais que utilizam os hospedeiros naturais da infecção por *Brucella* com o objetivo de avaliar o índice de proteção induzida no hospedeiro principal. Curiosamente, as formulações de vacinas inativadas demonstraram potencial de proteção, sugerindo que esta abordagem deve ser considerada para estudos futuros no campo da vacinologia contra *Brucella* (CARVALHO et al., 2020).

3.5 Sistemas transportadores do tipo ABC

O sequenciamento do genoma de *B. ovis* cepa ATCC 25840, resultou na identificação de uma ilha específica de 26,5 kb no cromossomo II (número de acesso do GenBank [NC_009504](#)) que compreende 28 quadros de leitura aberta denominada (*open reading frame* - ORFs) (TSOLIS et al., 2009). Posteriormente, foram identificados fatores de virulência nesta ilha, tendo então sido denominada ilha de patogenicidade 1 de *B. ovis* (BOPI-1) Carvalho et al., 2020, que está ausente em outras espécies clássicas de *Brucella*, mas que foi detectada em três isolados marinhos de *Brucella* de golfinhos-nariz-de-garrafa (TSOLIS et al., 2009).

A caracterização de BOPI-1 resultou na identificação de genes que codificam proteínas de *B. ovis* potencialmente envolvidos na patogênese, incluindo ORFs que codificam um transportador tipo ABC (*ATP-binding cassette transporter*) cujos ORFs foram denominados *abcABCDE* (TSOLIS et al., 2009; SILVA et al., 2011a).

Os sistemas transportadores do tipo ABC são constituídos por duas proteínas de ligação, proteínas que hidrolisam o ATP e proteínas que se ligam a um substrato específico. Esses sistemas concebem uma família de proteínas com domínios transmembrânicos, considerados importantes fatores de virulência para bactérias, incluindo bactérias do gênero *Brucella* (ROSINHA et al., 2002; SILVA et al., 2011a). Eles são responsáveis por exportar toxinas e antibióticos para o meio extracelular, além de transportar substratos como íons, aminoácidos, peptídeos e ferro que são fundamentais para a manutenção do organismo (KO; SPLITTER, 2000). *B. ovis* é a espécie de *Brucella* spp. com menor número de transportadores ABC funcionais, isso está relacionado com a presença de um elevado número de pseudogenes que estão relacionados a regiões que codificam os sistemas ABC. Silva et al (2014) pesquisaram a função de um ABC transportador específico de *B. ovis* (AbcEDCBA) e observaram que este locus específico interfere na expressão de proteínas do sistema de secreção tipo IV, resultando na evasão lisossomal de *B. ovis*.

Estudos prévios feitos no Laboratório de Patologia Molecular (LPM), da Escola de Veterinária da UFMG, levaram ao desenvolvimento de uma estirpe de *B. ovis* que possui mutação em dois genes presentes nessa ilha de patogenicidade. A deleção desses genes reduz a capacidade de multiplicação da cepa em células HeLa (SILVA et al., 2014). A ausência deste transportador ABC em particular resultou na atenuação *in vitro* e *in vivo* em camundongos e ovelhas (SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2013), dessa forma, a utilização da cepa mutante de *B. ovis* $\Delta abcBA$ com finalidade vacinal já foi investigada nas espécies murina e ovina e representa uma vacina em potencial contra a infecção por *B. ovis* (SILVA et al., 2015a; SILVA et al., 2015b).

3.6 Citologia vaginal e ciclo estral nas fêmeas de camundongo BALB/c

O ciclo estral nos camundongos tem duração curta de 4 a 5 dias, a idade ideal para o acasalamentos ocorre entre 6 e 8 semanas de vida do animal pois é nessa idade em que as fêmeas iniciam a ovulação (Guénet et al., 2015). O período gestacional é de 19 a 22 dias, variando com a linhagem. Durante o ciclo estral são reconhecidas quatro fases com características morfológicas distintas, as quais podem ser identificadas pelas características do esfregaço vaginal, através da técnica descrita por Shorr (1941). O proestro é a fase que antecede o estro, nessa fase há o predomínio de células epiteliais nucleadas, no estro é possível observar o predomínio de células cornificadas, isto é, célula epitelial sem núcleo é nessa fase que acontece

o pico de concentração de estrógeno e a fêmea aceita a monta, no metaestro é possível observar a presença de leucócitos, células cornificadas e células epiteliais, nessa fase a concentração de estrógeno começa a abaixar e a concentração de progesterona começa a subir, no diestro é possível observar o predomínio de leucócitos (SHORR, 1941).

3.7 Placentação

A placenta é uma estrutura fetal com funções de respiração, nutrição, excreção e secreção hormonal. É constituída pela porção fetal, proveniente do córion, e a porção materna, formada pelo endométrio. Entre as duas porções se encontra a câmara intervillosa (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A placenta dos roedores possui formato discoide, à interação materno-fetal é restrita a essa área (BURTON et al., 2006). Na placentação desses animais ocorre invasão dos tecidos maternos pelos vasos fetais, a este resultando em placentação hemocorial (BURTON et al., 2006).

Histologicamente, a placenta dos camundongos é dividida em quatro regiões distintas, inicia-se a partir da decídua materna (composta por células endometriais e células natural killer uterinas (uNK), seguida da zona juncional (caracterizada por ser avascular, é composta por células trofoblásticas gigantes parietais e espongiotrofoblasto), labirinto (compartimento formado por células de origem tanto materna, quanto embrionária) e placa coriônica (composta por grandes vasos sanguíneos que são conectados aos vasos do cordão umbilical do feto) (CROY et al., 2014).

Em ruminantes, a placenta é do tipo cotiledonária, isto é, as vilosidades se agrupam em estruturas proeminentes denominadas cotilédones, que se dá devido à presença de carúnculas endometriais. A junção dos cotilédones com as carúnculas forma as unidades placentárias denominadas placentomos, sendo que a vaca gestante desenvolve entre 70 e 120 placentomos, que são as estruturas responsáveis pela troca fisiológica entre a mãe e o feto (BJORKMAN; SOLLEN, 1960; NASCIMENTO; SANTOS, 2021).

Histologicamente o epitélio coriônico é constituído por uma única camada celular, contudo as células trofoblásticas embrionárias são compostas por dois tipos diferentes: células principais ou uninucleadas e células binucleadas (STEVEN, 1984).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ (SILVA et al., 2011). O inóculo foi cultivado em placas contendo TSA, 1% de hemoglobina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina, por 3 dias, a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , sendo suspensa em PBS estéril. A concentração do inóculo foi estimada por espectrofotometria no instrumento SmartSpec (Bio-Rad) em densidade óptica de 600 nm (OD600) conforme estabelecido por Silva et al., 2011. Para a formulação do inóculo foi utilizado volume de 100 μL contendo 1×10^6 UFC/animal *B. Ovis* $\Delta abcBA$, o inóculo do grupo que foi vacinado com a cepa mutante foi encapsulado com alginato de acordo com o protocolo realizado por Silva et al. (2015).

4.1. Cultivo da cepa virulenta *Brucella ovis* ATCC 25840

O inóculo foi cultivado em placas contendo TSA, 1% de hemoglobina por 3 dias, a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , sendo suspensa em PBS estéril. A concentração do inóculo foi estimada por espectrofotometria no instrumento SmartSpec (Bio-Rad) em densidade óptica de 600 nm (OD600), Para a formulação do inóculo foi utilizado volume de 100 μL contendo 1×10^6 UFC/animal de *B. ovis* ATCC 25840.

4.2. Delineamento experimental

Quarenta camundongos BALB/c fêmeas e 20 camundongos BALB/c machos (entre 3 e 4 semanas de idade) foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMG, os animais foram alojados em gaiolas e divididos aleatoriamente. As fêmeas foram divididas em quatro grupos de 10 animais cada: Grupo 1 - inoculado com solução salina estéril (PBS) e desafiado com PBS (PBS/PBS); Grupo 2 - inoculado com PBS e desafiado com *B. ovis* WT (PBS\WT); Grupo 3 - inoculado com PBS e desafiado com *B. ovis* $\Delta abcBA$ (PBS/ $\Delta abcBA$) e Grupo 4 - vacinado com *B. ovis* $\Delta abcBA$ e desafiado com *B. ovis* WT ($\Delta abcBA$ /WT). Os camundongos machos foram alojados isoladamente, com apenas um animal por caixa (para evitar conflito), mantidos a 24°C, e ciclo luz-escuro de 12 horas. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob protocolo número 202/2020.

As fêmeas ficaram em período de adaptação até completarem 5 a 6 semanas de idade e então foi realizado o seguinte protocolo de imunização: (Grupo 1 ao 3: foram inoculados 100 μ L de PBS estéril por via subcutânea; Grupo 4 foi vacinado com 100 μ L de formulação experimental *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato por via subcutânea). Quando completaram 9 a 10 semanas de vida, as fêmeas foram estimuladas ao estro de forma natural, utilizando a maravalha do camundongo macho conforme estabelecido por Donadio et al. (1986). A confirmação do estro foi realizada por citologia vaginal. Após a confirmação do estro, foi introduzido em cada grupo a proporção de um camundongo macho para cada duas fêmeas para o cruzamento em caixas separadas (perfazendo um total de cinco camundongos machos por grupo). Após a visualização do *plug* (Figura 1), as fêmeas retornaram as suas respectivas caixas e foram pesadas todos os dias. Durante a sincronização de estro com a maravalha dos camundongos machos, foi realizada a coleta de lavado vaginal e observação do esfregaço vaginal em microscópio óptico comum sem uso de condensador (campo escuro), em aumentos de 10 e 40 vezes. A coleta foi realizada diariamente, sempre no mesmo horário para assegurar a regularidade do ciclo antes do início da realização do experimento. Três tipos de células foram identificados: Células epiteliais, células cornificadas e leucócitos, possibilitando a identificação da fase do ciclo estral de cada animal (Figura 2).

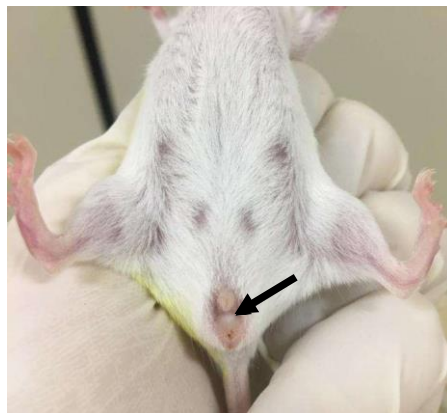


Figura 1 - Identificação do *plug* vaginal (seta preta).

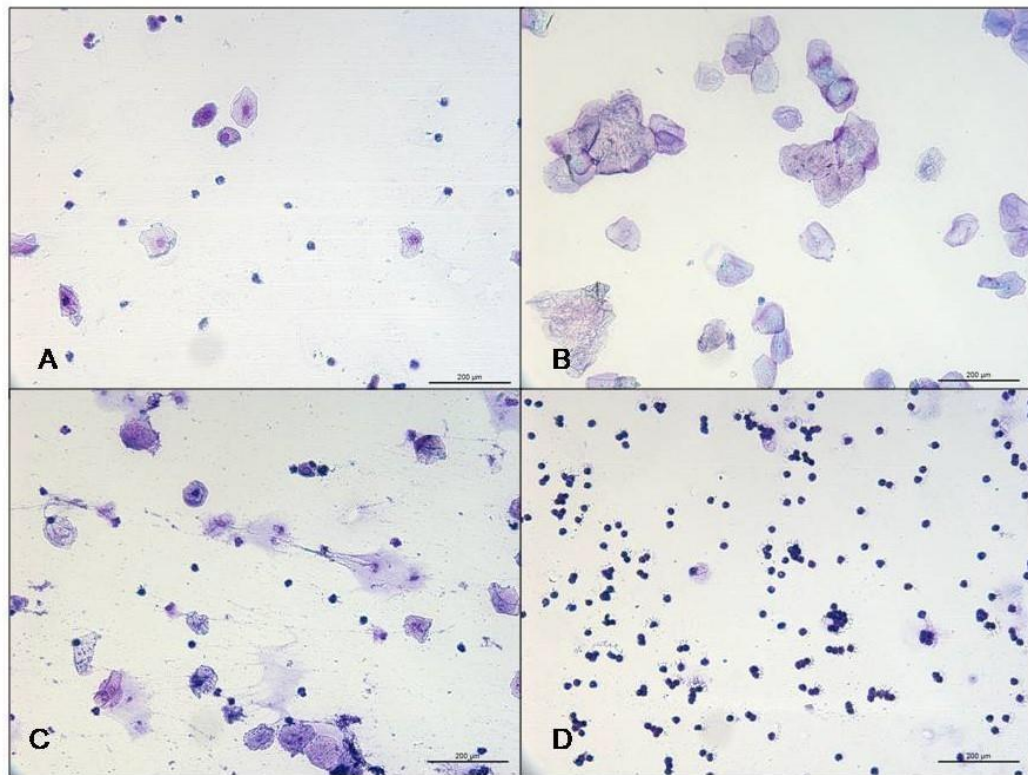


Figura 2 -. Citologia vaginal. (A) Proestro: predomino de células epiteliais nucleadas. (B) Estro: predomínio de células cornificadas. (C) Metaestro presença de leucócitos, células cornificadas e células epiteliais. (D) Diestro: predomínio de leucócitos.

Cinco dias após a visualização do *plug* vaginal, as fêmeas foram desafiadas intraperitonealmente conforme o seguinte protocolo: 100 µL de PBS estéril (Grupo 1), 100 µL de 1×10^6 UFC/animal de *B. ovis* WT (Grupo 2), 100 µL 1×10^6 UFC/animal *B. Ovis* $\Delta abcBA$ (Grupo 3) e 100 µL de 1×10^6 UFC/animal de *B. ovis* WT (Grupo 4). Doze dias após o desafio, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (xilazina 2%, 30 mg/Kg associada a cetamina 10%, 300 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal e foi realizado a necropsia para a coleta de baço, fígado, glândula mamária, útero, feto e placenta para exame bacteriológico e histopatológico.

4.3. Histopatologia

Fragmentos de baço, fígado, útero, glândula mamária, placenta e feto foram fixados por imersão em formalina tamponada a 10% por 24 horas, seguido por desidratação em

concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os fragmentos foram seccionados em 4 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica. Foram determinadas as lesões compatíveis com infecção por *Brucella* spp. como microgranulomas e necrose no fígado e microgranulomas no baço, além de necrose em placenta e feto. As lesões foram classificadas de acordo com sua intensidade em 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado ou 3 = intenso (SILVA et al., 2015).

4.4 Bacteriologia

Fragmentos de tecido foram coletados assepticamente, pesados em tubos tipo *Falcon* e homogeneizados em 2 mL de uma solução PBS estéril usando um homogeneizador (Hamilton Beach, Estados Unidos). Cada amostra foi submetida a diluições seriadas de 10 vezes para contagem de UFC. Depois de 4 dias de crescimento em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, o número de UFC por grama de órgão (baço e fígado) ou o número total de CFU por órgão (útero, placenta, glândula mamária e feto).

4.5 Imunoistoquímica

Para localização *in situ* de antígenos de *B. ovis*, foi realizada imunoistoquímica dos mesmos tecidos utilizados para histopatologia, seguindo o protocolo descrito por Silva *et al.* (2011): os cortes em lâminas foram diafinizados, hidratados em concentrações decrescentes de etanol, lavados com PBS por 5 minutos e incubados com solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 1 hora, para bloquear a peroxidase endógena. Após lavar novamente com PBS, as lâminas foram transferidas para câmara úmida à temperatura ambiente e incubadas com solução de leite em pó desnatado (25 µg/mL) por 45 minutos, para diminuir marcações inespecíficas no corte. Posteriormente, os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo primário policlonal anti-*Brucella* spp, na diluição de 1:1000. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes com PBS, incubados com anticorpo secundário EnVision™ FLEX+ system – Dako por 30 minutos, seguida de nova lavagem com PBS e imunomarcação com cromógeno 3’3- diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen system; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA) (DAB) por 30 segundos e as lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer por 35 segundos. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

4.6 Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6. Os dados de recuperação bacteriana foram normalizados por transformação logarítmica e, então, submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi usado comparar os escores histopatológicos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Alterações patológicas

Para a confirmação da gestação foram avaliados diariamente o peso das fêmeas (Figura 3 e 4) e a distensão abdominal (Figura 5). A frequência da ocorrência da gestação nos diferentes grupos foi: Grupo controle (3\10); PBS/ $\Delta abcBA$ (7\10); $\Delta abcBA$ /WT (6\10), com dois casos de morte fetal; PBS/WT (5\10), com 2 casos de morte fetal. Durante a necropsia foi possível observar que as fêmeas dos grupos desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis* que tiveram seu peso estagnado, o que é um achado compatível com a ocorrência de morte embrionária (Figura 6).

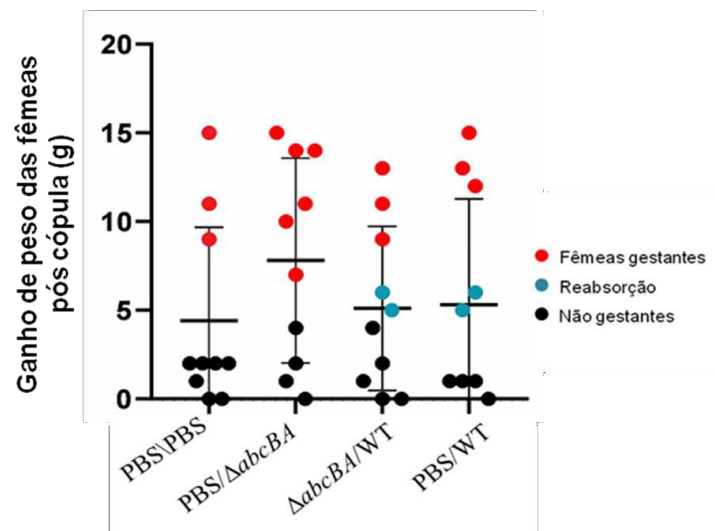


Figura 3. Análise de peso para confirmação da gestação. Os camundongos foram divididos em quatro grupos PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT (n = 10 por grupo). Após a visualização do *plug* vaginal foi realizado diariamente a pesagem das fêmeas até o dia da eutanásia. Os pontos representam as fêmeas gestantes, não gestantes ou que tiveram morte fetal (indicadas por diferentes cores conforme a legenda) e as barras a média/SD.

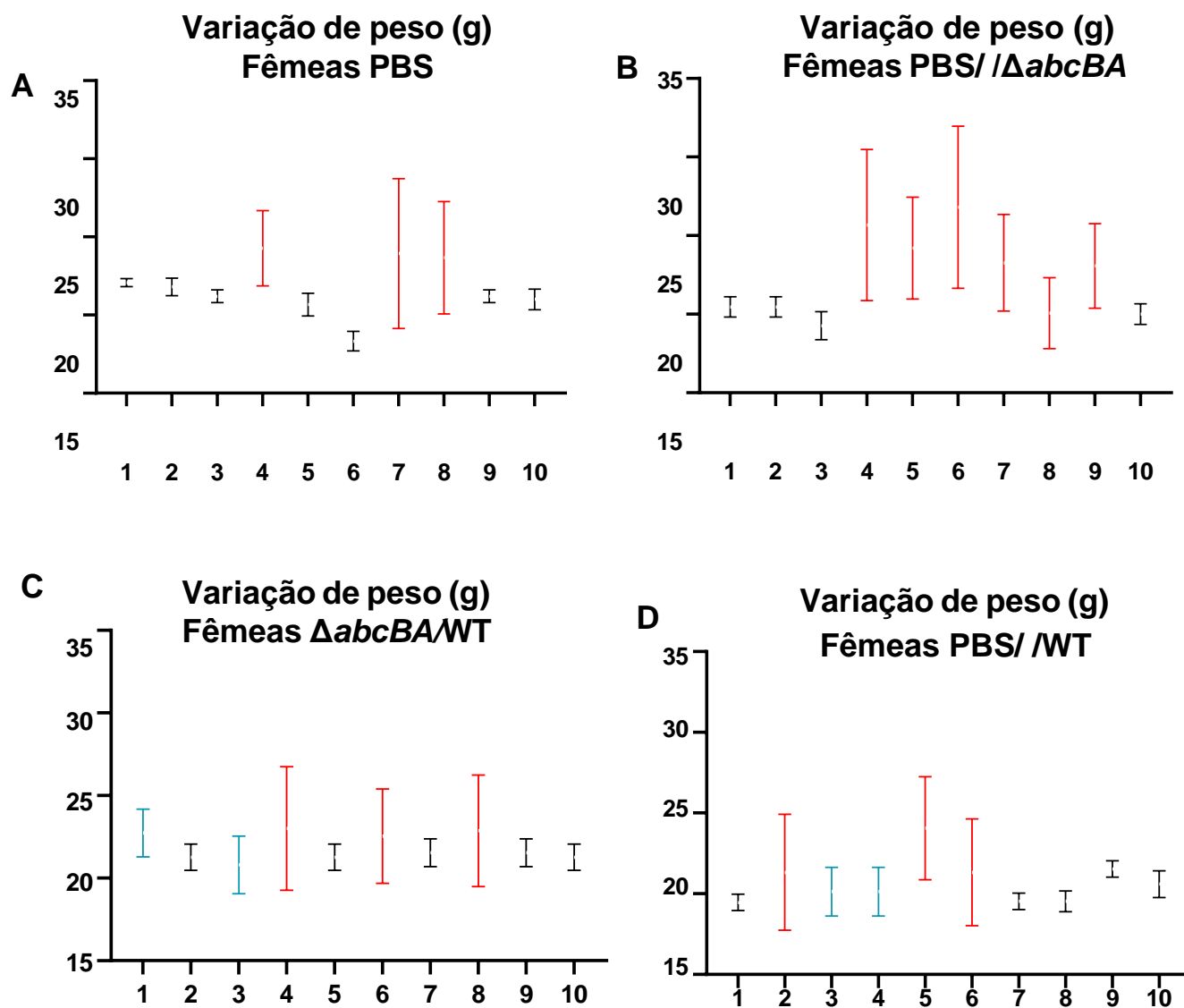


Figura 3 - A- Variação de peso das fêmeas PBS/PBS do dia da cópula até o dia da eutanásia. B- Variação de peso das fêmeas PBS/ $\Delta abcBA$ do dia da cópula até o dia da eutanásia. C- Variação de peso das fêmeas $\Delta abcBA$ /WT do dia da cópula até o dia da eutanásia (D) Variação de peso das fêmeas PBS/WT do dia da cópula até o dia da eutanásia. (n = 10 por grupo). As barras pretas representam fêmeas não gestantes, vermelhas: fêmeas gestantes, azuis: morte embrionária



Figura 4 - (A) Fêmea não gestante. (B) Fêmea gestante com moderada distensão abdominal.



Figura 5 - Comparação do útero não gestante, útero gestante e útero com mortalidade fetal do grupo PBS/WT (n = 10). (A) Útero não gestante. (B) Útero gestante. (C) Útero com reabsorção fetal (seta preta).

Macroscopicamente, observou-se que 100% das placentas das fêmeas gestantes que foram desafiadas com *B. ovis* WT, seja grupo previamente vacinado com a cepa mutante ou não, possuíam uma área focalmente extensa esbranquiçada, de consistência friável sugestiva de necrose (Figura 7), interpretação confirmada durante a avaliação histopatológica. O baço desses animais estava aumentado de tamanho e era mais pesado quando comparado ao dos outros grupos (Figura 8).



Figura 6 - Placenta do grupo PBS\WT, nota-se área circular, esbranquiçada, de consistência friável, sugestiva de necrose (seta preta).

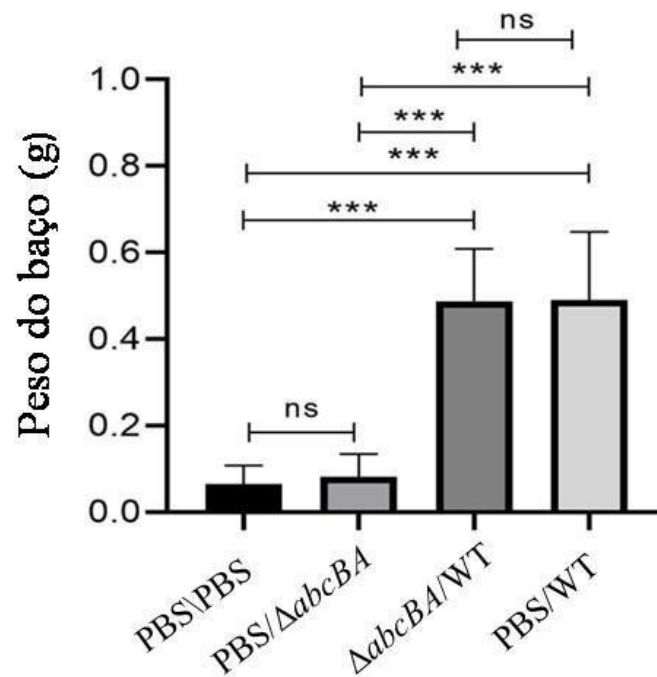


Figura 7 - Peso do baço das fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/\DeltaabcBA; \DeltaabcBA\WT; PBS\WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: *** ($P < 0.001$); ns: não significativo.

A histopatologia mostrou que no fígado das fêmeas do grupo PBS/WT, havia numerosos microgranulomas no parênquima (Figura 9) caracterizado por infiltrado inflamatório linfocitário e neutrofílico, multifocal aleatório associado à necrose multifocal moderada. No fígado das fêmeas do grupo $\Delta abcBA$ /WT houve a redução na quantidade e intensidade de microgranulomas (Figura 9). No fígado das fêmeas dos grupos PBS/PBS e PBS/ $\Delta abcBA$ não foram visualizadas alterações atribuídas à infecção por *B. ovis*. Os microgranulomas observados no fígado dos grupos desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis* apresentaram imunomarcagem positiva para *B. ovis* (Figura 9).

Na polpa branca e na zona marginal do baço dos animais dos grupos PBS/WT e $\Delta abcBA$ /WT, havia microgranulomas com imunomarcagem positiva para *B. ovis* (Figura 10). Ao contrário dos grupos PBS/PBS e PBS/ $\Delta abcBA$, em que não foram observadas alterações.

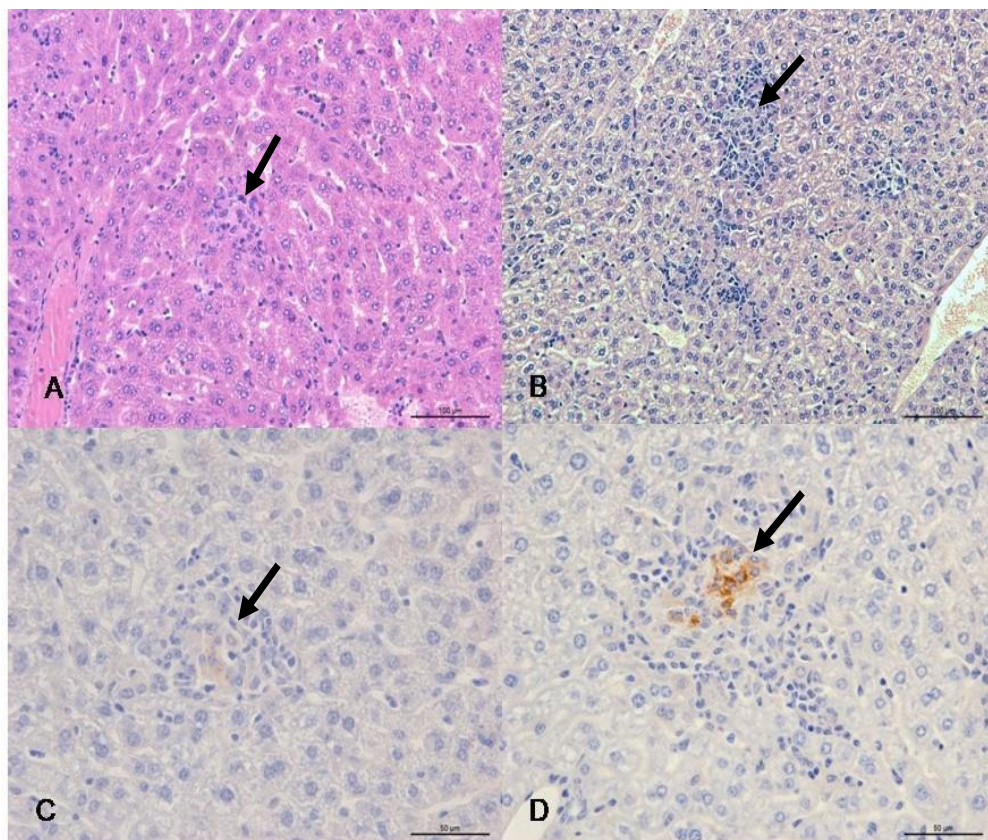


Figura 8 - (A) Fígado do grupo $\Delta abcBA$ /WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE 20x. (B) Fígado, do grupo PBS/ WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE. 20x. (C) Fígado do grupo $\Delta abcBA$ /WT, imunomarcagem positiva para *B. ovis* (seta preta), 40x. (D) Fígado do grupo PBS/ WT, imunomarcagem positiva para *B. ovis* (seta preta), 40x

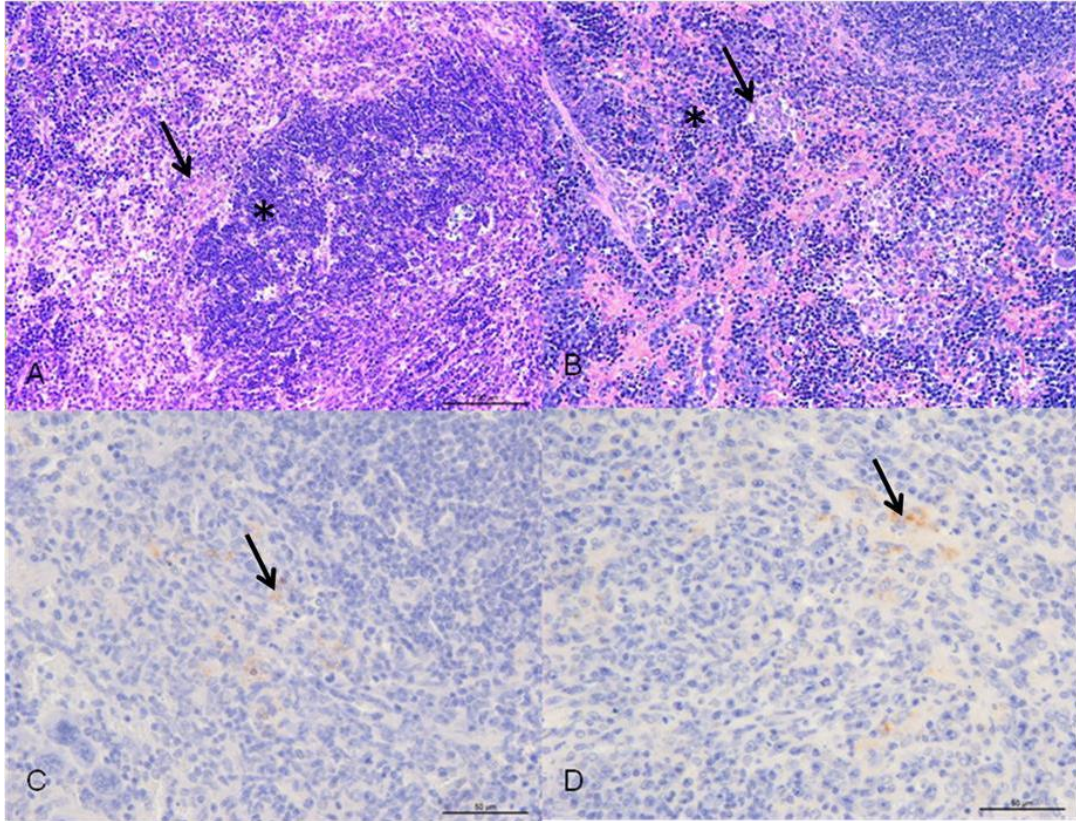


Figura 9 - (A) Baço, grupo $\Delta abcBA/WT$ a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE 20x. (B) Baço, grupo PBS/WT a seta preta indica a formação de microgranuloma, HE 20x. (C) Baço do grupo $\Delta abcBA/WT$, imunomarcagem para *Brucella* spp. (seta preta), 40x. (D) Fígado do grupo PBS/WT, imunomarcagem positiva para *B. ovis* (seta preta), 40x.

Nos úteros do grupo PBS/WT, havia infiltrado linfoplasmocitário difuso e moderado com ocasionais neutrófilos na mucosa endometrial. O infiltrado por vezes se estendia com distribuição multifocal nas camadas muscular e serosa. No lume havia exsudato com abundante quantidade de restos celulares necróticos associados à fibrina, por vezes restos fetais foram observados, caracterizados como morte fetal (Figura 11). No útero das fêmeas do grupo $\Delta abcBA/WT$ houve redução da intensidade do infiltrado inflamatório e necrose, entretanto restos fetais foram observados, caracterizados como morte fetal (Figura 11). No útero dos grupos PBS/PBS e PBS/ $\Delta abcBA$ não foram visualizadas alterações histopatológicas.

Na placenta em região de decídua e zona juncional dos grupos PBS/WT e $\Delta abcBA/WT$, havia áreas multifocais e extensas de necrose associadas à deposição de fibrina e eritrócitos, miríade de bactérias basofílicas intralesionais foram visualizadas associadas a células trofoblásticas (Figura 12). Nos grupos PBS/PBS e PBS/ $\Delta abcBA$ foram observadas

características morfológicas compatíveis com a gestação.

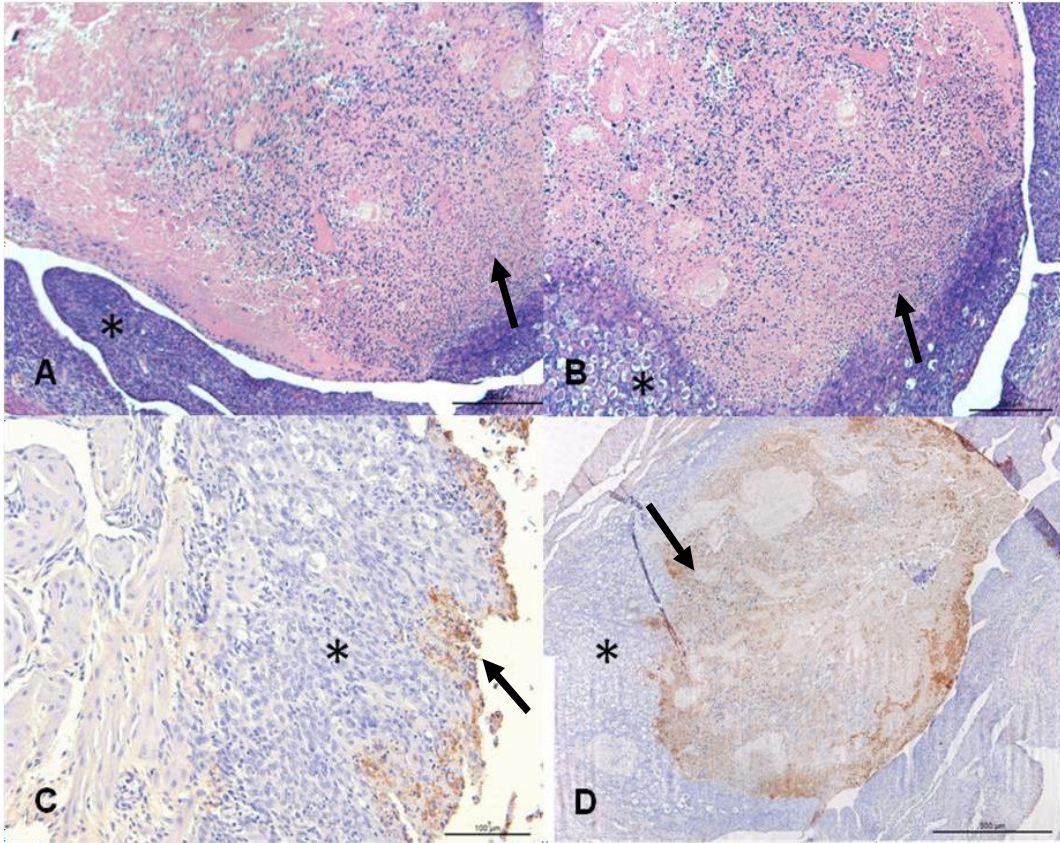


Figura 10 - (A) Útero, grupo $\Delta abcBA/WT$ ($n = 10$) a seta preta indica área acentuada de necrose e restos celulares compatíveis com morte fetal, esta área está associada ao endométrio (asterisco). HE 20x. (B) Útero, grupo PBS/WT ($n = 10$) a seta preta indica área acentuada de necrose e restos celulares compatível com reabsorção fetal, esta área está associada ao endométrio (asterisco). HE 20x. (C) Útero do grupo $\Delta abcBA/WT$ ($n = 10$), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta) o asterisco indica o endométrio. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 40x. (D) Útero do grupo PBS/WT ($n = 10$), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica o endométrio. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. 40x.

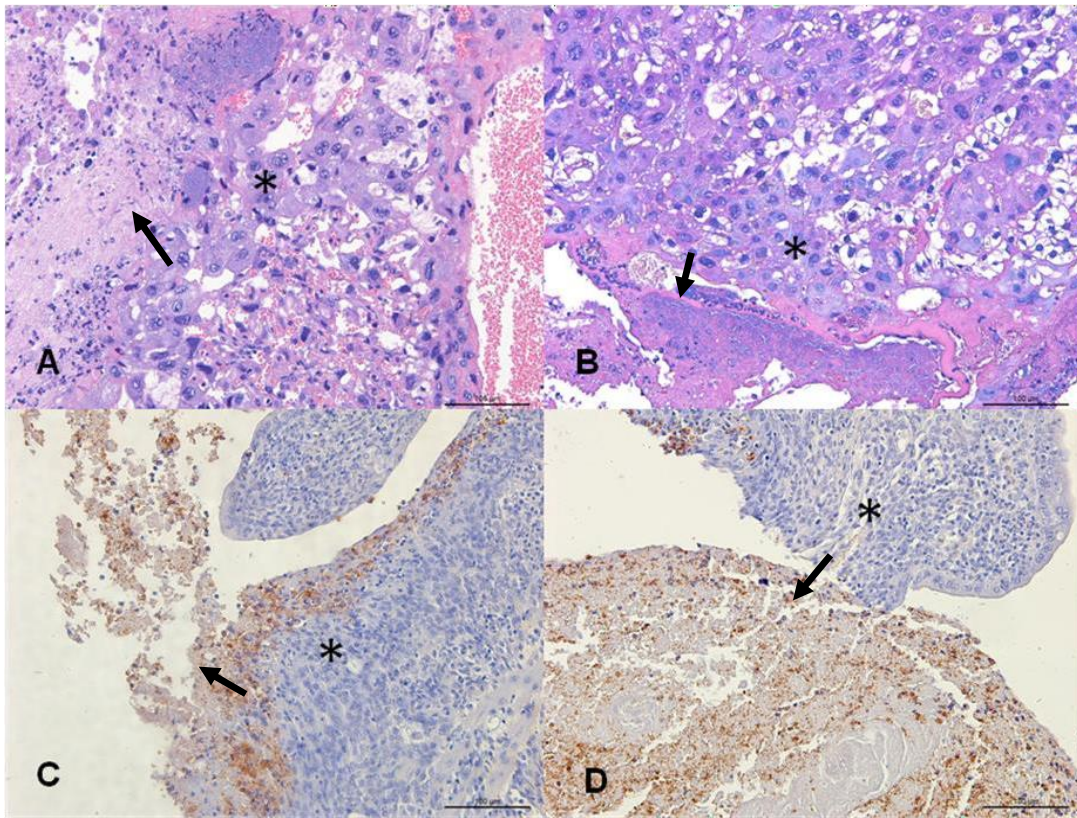


Figura 11 - (A) - Placenta, grupo $\Delta abcBA/WT$ ($n = 10$) a seta preta indica área focalmente extensa de necrose e restos celulares associada a miríade de bactérias (seta branca), esta área está localizada na decídua materna (asterisco). HE 20x. (B) Placenta, de Mayer, 20x. (D) Placenta do grupo PBS/B. ovis WT ($n = 10$), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica a decídua materna. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 20x. C) Placenta do grupo $\Delta abcBA/WT$ ($n = 10$), imunomarcção positiva para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica a decídua materna. DAB e contra-coloração com hematoxilina de Mayer, 40x. (D) Placenta do grupo PBS/B. ovis WT ($n = 10$), imunomarcção para *Brucella* spp. (seta preta), o asterisco indica a decídua materna. DAB e contra-coloração com

Nos fetos do grupo PBS/WT, as alterações visualizadas foram discretas, envolviam fígado com o aumento do número de neutrófilos no parênquima, predominantemente intravasculares em capilares sinusoides, mas, por vezes, formando agregados. Nos demais grupos ($\Delta abcBA/WT$, PBS\PBS e PBS/ $\Delta abcBA$) não foram visualizadas alterações histopatológicas.

5.2 Escore histopatológico

Para a elaboração do escore histopatológico, as lesões foram classificadas de acordo com sua intensidade: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado ou 3 = intenso (Silva et al., 2015). Observou-se que no fígado houve redução significativa (* $p < 0,05$) no escore de lesões histopatológicas no grupo $\Delta abcBA$ /WT quando comparado ao grupo PBS/WT. Fato este que não ocorreu durante a avaliação de baço e placenta. Em todos os órgãos avaliados os grupos PBS/PBS e PBS/ $\Delta abcBA$ não apresentaram lesões além de apresentaram diferença estatística de (**** $p < 0,0001$) quando comparado aos grupos PBS/WT e $\Delta abcBA$ /WT (Figura 13).

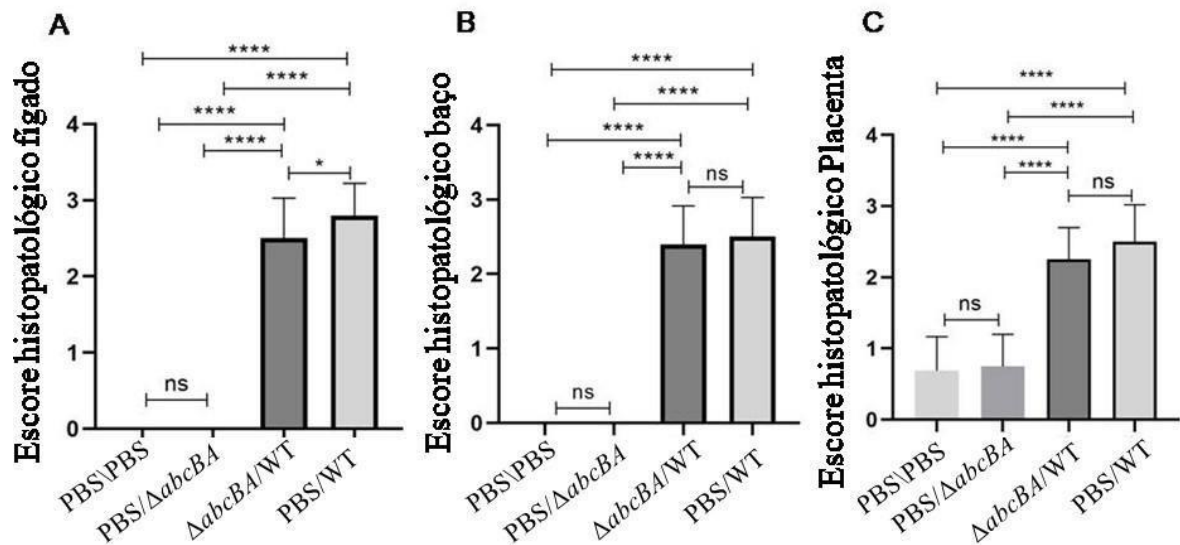


Figura 12 (A) Escore das alterações histopatológicas do fígado dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (* $p < 0,05$); (**** $p < 0,0001$); ns: não significativo. (B) Avaliação do escore histopatológico do baço dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (**** $p < 0,0001$); ns: não significativo. (C) Avaliação do escore histopatológico da placenta dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (**** $p < 0,0001$); ns: não significativo.

5.3 Isolamento bacteriano

A vacinação com a cepa mutante de *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato resultou em resposta imunológica protetora no fígado com redução significativa de UFC (* $p < 0,05$) quando comparado os grupos $\Delta abcBA/WT$ e PBS/WT, fato este que não ocorreu no baço (Figura 14). A cepa mutante não foi isolada dos órgãos supracitados.

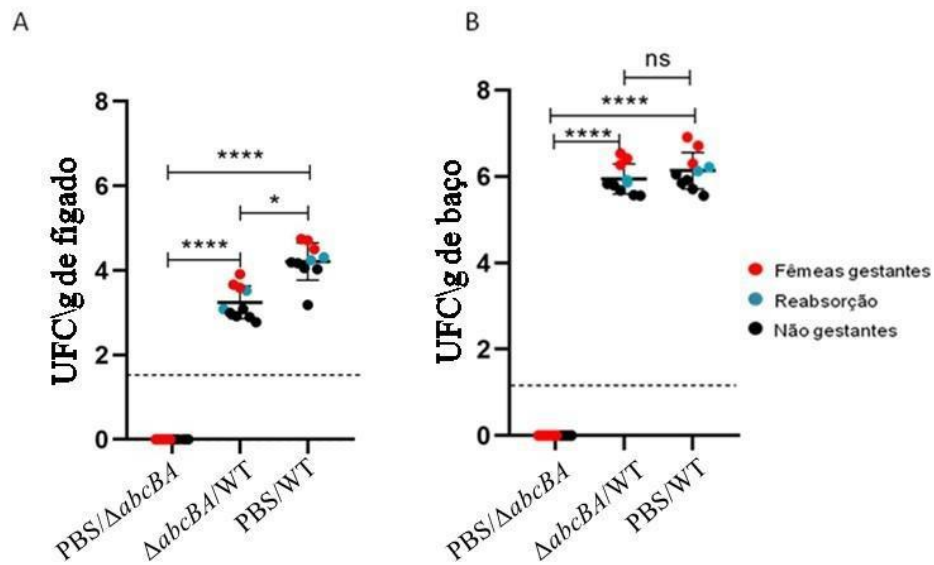


Figura 13 - (A) Recuperação de *Brucella ovis* por grama de fígado em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (* $p < 0,05$); (** $p < 0,001$); (***) $p < 0,0001$). (B) Recuperação bacteriana de amostra virulenta e mutante de *B. ovis* por grama de baço em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA/WT$; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre os grupos são indicadas por asteriscos: (**** $p < 0,0001$), ns: não significativo.

Na glândula mamária e útero houve recuperação bacteriana de *B. ovis* WT em ambos os órgãos (Figura 15). No útero houve menor recuperação bacteriana no grupo $\Delta abcBA$ /WT quando comparado ao grupo PBS/WT, evidenciando que a vacina produzida a partir da cepa mutante de *B. ovis* $\Delta abcBA$ teve proteção eficaz de aproximadamente 1 log de UFC/g de útero. Além disso, também foi possível observar que no útero o estado fisiológico da gestação induziu maior colonização bacteriana no órgão, fêmeas gestantes tiveram uma maior recuperação bacteriana quando comparadas as fêmeas não gestantes do mesmo grupo (Figura 15). Contudo, não houve diferença significativa durante a avaliação em glândula mamária quando comparado os grupos desafiados com a cepa de *B. ovis* WT e o estado fisiológico das fêmeas (Figura 15).

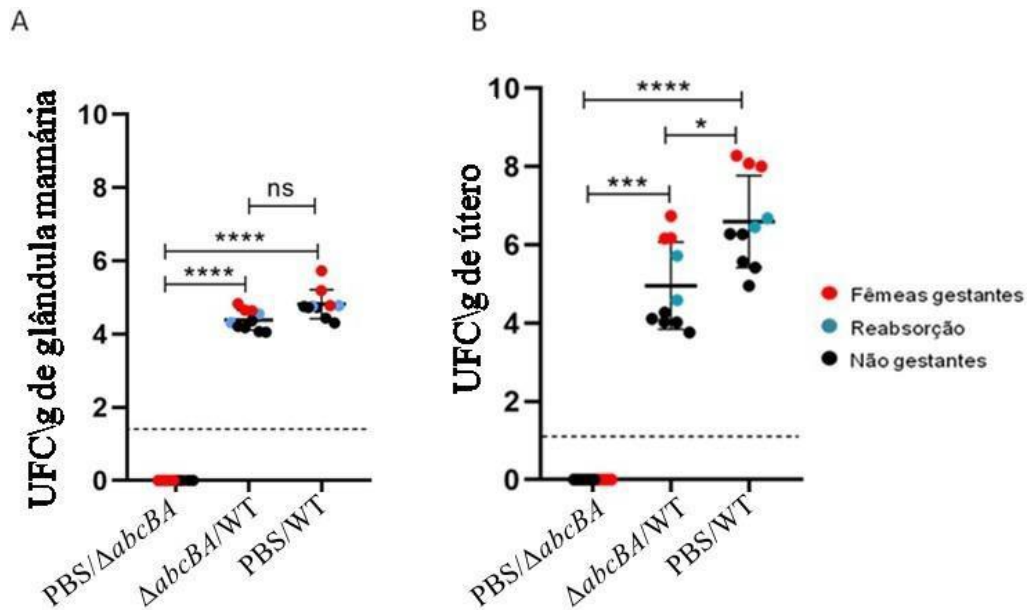


Figura 14 - (A) Recuperação de *Brucella ovis* por grama de glândula mamária em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$; ns: não significativo. (B) Recuperação de *B. ovis* por grama de útero em fêmeas gestantes e não gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/ $\Delta abcBA$; $\Delta abcBA$ /WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre os grupos são indicadas por asteriscos: (*) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ (****) $p < 0,0001$.

Na avaliação de placenta e feto observou-se que houve menor recuperação bacteriana nos fetos do grupo $\Delta abcBA$ /WT quando comparado ao fetos do grupo PBS/WT, evidenciando que nos fetos a vacina $\Delta abcBA$ induziu resposta imune protetora. Contudo, não houve diferença significativa durante a avaliação em placenta quando comparado os grupos desafiados com a cepa de *B. ovis* WT (Figura 16).

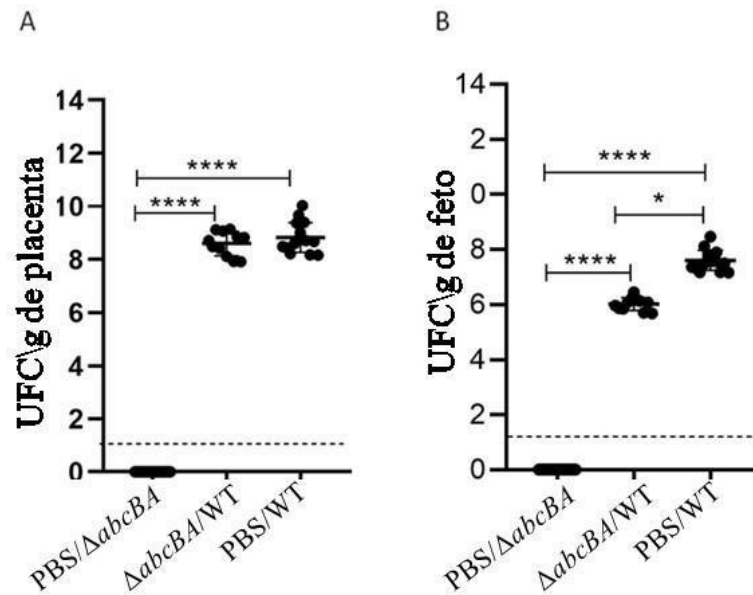


Figura 15 - (A) Recuperação de *Brucella ovis* por grama de placenta em fêmeas gestantes dos grupos: PBS\PBS; PBS/\Delta abcBA; \Delta abcBA/WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças estatísticas entre o controle negativo e os demais grupos são indicadas por asteriscos: (**** p < 0,0001). (B) Recuperação bacteriana de amostra virulenta e mutante de *B. ovis* por grama de feto dos grupos: PBS\PBS; PBS/\Delta abcBA; \Delta abcBA/WT; PBS/WT. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal- Wallis. Diferenças estatísticas entre os grupos são indicadas por asteriscos: (* p < 0,01); (** p < 0,001). (**** p < 0,0001).

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que mostra a cinética da infecção de *B. ovis*, bem como de uma cepa viva atenuada de *B. ovis* com potencial vacinal em fêmeas gestantes. O significado deste estudo reflete no fato de que *B. ovis* é um dos mais importantes agentes causadores de

infertilidade nos rebanhos ovinos ao redor do mundo. Apesar de alguns países utilizarem a cepa vacinal Rev 1 contra a infecção por *B. ovis*, essa vacina não é liberada em regiões

geográficas onde a *B. melitensis* é exótica, como por exemplo, o Brasil (GRILLÓ et al., 2000). Considerando a não existência de uma cepa vacinal segura e específica para a prevenção de *B. ovis* e os dados promissores publicados utilizando a cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015), que demonstraram a atenuação e a capacidade protetora da cepa mutante *in vitro* e nas espécies murina e ovina com ausência da eliminação do agente pelos fluidos biológicos, juntamente com os resultados obtidos durante este estudo, uma vez que a cepa mutante de *B. ovis* $\Delta abcBA$ não induziu lesões e não foi recuperada de nenhum órgão. Isso sugere que, provavelmente, esta cepa mutante atenuada é altamente segura e uma forte candidata vacinal.

É importante ressaltar que este é o primeiro estudo envolvendo a utilização desta cepa em fêmeas gestantes, esses dados suportam a hipótese de que a cepa mutante $\Delta abcBA$ pode ser uma cepa vacinal adequada para fêmeas gestantes e deve ser objeto de futuros estudos envolvendo o hospedeiro natural, uma vez que o modelo murino já mostrou ser menos permissivo à resposta vacinal do que o hospedeiro natural (CARVALHO et al., 2020; SILVA et al., 2015). Além disso, a cepa *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato apresentou potencial de proteção contra diferentes cepas de *B. ovis* isoladas de campo (CARVALHO et al., 2020), bem como contra *B. canis* (ECKSTEIN et al., 2020) e *B. melitensis* (COSTA et al., 2020) em condições experimentais.

Silva et al. (2015) avaliou o índice de proteção induzido pela vacinação com cepa mutante de

B. ovis $\Delta abcBA$ encapsulada e não encapsulada com alginato durante a infecção (IP) e subcutânea por *B. ovis* WT em camundongos e observou que camundongos Black 6 obtiveram um maior índice de proteção quando comparado aos camundongos Balb/c, com diferença significativa de UFC somente no fígado em ambas as linhagens, esses dados são similares ao observado neste trabalho. No modelo murino, o baço e fígado são os principais órgãos afetados durante a infecção por *Brucella* spp., sendo que esses órgãos apresentam elevada colonização bacteriana (SILVA et al., 2011). Macroscopicamente, em infecções com doses elevadas de *Brucella* spp. observa-se esplenomegalia (ENRIGHT et al., 1990). Histologicamente, o baço apresenta depleção dos folículos linfóides associado a infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitário com formação de microgranulomas (ENRIGHT et al., 1990; TOBIAS et al., 1993, BYNDLOSS et al., 2019; SILVA et al., 2015), enquanto no fígado há infiltrado inflamatório

neutrófilico e histiocitário com formação de microgranulomas multifocais dispersos no parênquima (ENRIGHT et al., 1990; TOBIAS et al., 1993; BYNDLOSS et al., 2019; SILVA et al., 2015). Essas informações corroboram com os resultados observados neste estudo.

Por se tratar de um patógeno causador de alterações reprodutivas e aborto, estudos envolvendo a cinética da infecção em fêmeas gestantes têm se tornado cada vez mais frequente. Em fêmeas BALB/c gestantes infectadas com *B. abortus* observou-se placentite neutrofílica e necrotizante multifocal a coalescente acentuada com bactéria intracelular em células trofoblásticas, confirmada por imunistoquímica. A severidade das lesões e colonização bacteriana na placenta aumenta de acordo com o curso da gestação (TOBIAS et al., 1993; KIM et al., 2005; BYNDLOSS et al., 2019) o que explica a recuperação bacteriana na placenta de animais gestantes ser maior que a de animais que tiveram morte embrionária, que por sua vez é maior que a de animais não gestantes observados durante este estudo. As lesões descritas no modelo de estudo experimental de camundongos gestantes infectadas com *B. abortus* (BYNDLOSS et al., 2019) são similares às lesões encontradas durante à infecção por *B. ovis* neste modelo. Assentindo que *B. ovis* tem tropismo para células trofoblásticas e órgãos reprodutores de fêmeas gestantes.

Neste estudo foi demonstrado que houve recuperação bacteriana da cepa virulenta de *B. ovis* em fêmeas gestantes e não gestantes no baço, fígado, glândula mamária, útero, placenta e feto. Achado esse que não foi observado durante a avaliação de *B. ovis* $\Delta abcBA$. A cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ além de não ter sido reisolada em nenhum dos órgão supracitados, também não induziu lesões macroscópicas e histopatológicas, resultados que indicam que esta cepa é segura e atenuada nesse modelo de estudo experimental. Além disso, *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi capaz de produzir resposta imunológica protetora caracterizada por menor carga bacteriana no fígado, útero e feto, após imunização experimental e desafio com *B. ovis* WT.

7. CONCLUSÕES

- A cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ não foi reisolada de nenhum dos órgão avaliados e não induziu lesões macro ou microscópicas, indicando que esta é uma cepa segura e atenuada nesse modelo experimental.
- A *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi capaz de produzir resposta imunológica protetora, caracterizada por menor carga bacteriana no fígado, útero e feto, após o desafio com *B. ovis* WT.

- A cinética da infecção por *B. ovis* em modelo murino gestante é similar ao previamente descrito na literatura em referência à infecção por *B. abortus* no mesmo modelo.
- *Brucella ovis* coloniza placenta e tem predileção para células trofoblásticas de fêmeas gestantes. Além de induzir lesões macroscópicas e microscópicas de caráter necrotizante.

REFERÊNCIAS

- AUDIC, S.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J.M.; *et al.* *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. **BMC Genomics**, [s.l.], v.10, p. 10-352, 2009.
- ATLURI, V.L.; XAVIER, M.N.; JONG, M.F.; *et al.* Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. **Annual Review of Microbiology**, [s.l.], v.65, p.523-541, 2011.
- BASTOS, R.; SOARES, C.; ELISEI, C.; *et al.* Avaliação genética das vacinas contra brucelose bovina comercializadas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v.32, n.10, 2012.
- BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press. 1990.
- BLASCO, J.M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. **Preventive Veterinary Medicine**, [s.l.], v.31, p.275-283, 1997.
- BRASIL. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. In: Secretaria de Defesa Agropecuária MDA, Pecuária e Abastecimento, editor. Brasília: Diário Oficial da União., p. 6-10, 2017a.
- BURTON, G.J., KAUFMANN, P., HUPPERTZ, B *et al.* Anatomy and genesis of the placenta. In: NEILL, J.D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3 ed. New York: Elsevier, p.189-243, 2006.
- BJÖRKMAN, N.; SOLLÉN, N. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [s.l.], v.1, p.347-362, 1960.
- BOSCHIROLI, M.L.; FOULONGNE, V.; O'CALLAGHAN, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v.4, n.1, p.58-64, 2001.
- BYNDLOSS, M.X.; TSAI, A.Y.; WALKER, G.T.; *et al.* *Brucella abortus* infection of placental trophoblasts triggers endoplasmic reticulum stress-mediated cell death and fetal loss via type IV secretion system-dependent activation of CHOP. **mBio**, [s.l.], v.10, e01538-19, 2019.
- CARVALHO, T. P. ; RIBEIRO, N. Q. ; MOL. J. P. S.; *et al.* Pathogenic potential of *Brucella ovis* field isolates with different genotypic profile and protection provided by the vaccine strain *B. ovis* abcBA against *B. ovis* field isolates in mice. **Pesquisa veterinária brasileira**, [s.l.], v. 40, p. 88-96, 2020.

COSTA, L. F. ; CABELLO, A. L. ; BATISTA, D. F. A.; et al. The candidate vaccine strain *Brucella ovis* Δ abcBA is protective against *Brucella melitensis* infection in mice. **Microbiology and immunology**, [s.l.], v. 64, p. 730-736, 2020.

CORBEL, M.J.; ELBERG, S.S.; COSIVI, O. (Ed.). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: World Health Organization Press., p.89, 2006.

CLAPP, K.H. A complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. **Australian Veterinary Journal**, [s.l.], v.31, p.27-28, 1955.

CARVALHO JUNIOR, C.A.; XAVIER, M.N.; COSTA, L.F. *et al.* Agentes infecciosos que podem promover infertilidade em machos da espécie ovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s.l.], v.34, n.3, p.160-167, 2010.

CARVALHO JUNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; *et al.* Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v.102, p.213-222, 2012.

CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.A.; PAIXÃO, T. A. *et al.* Meta-Analysis and advancement of brucellosis vaccinology. **Plos One**, [s.l.], v.11, n.11, e0166582, 2016.

CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.A.; PAIXÃO, T.A.; *et al.* Meta-analysis of brucellosis vaccinology in natural hosts. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v.40, n.8, p.604-613, 2020.

CROY, A., YAMADA, A.T., DEMAYO, F.J., *et al.* **The guide to investigation of mouse pregnancy**. London: Elsevier, 2014.

DORNELES, E.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M.S.; *et al.* Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**, [s.l.], v.33, n.31, p.3659- 3666, 2015.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v.8, n.2, p.117, 2010.

ECKSTEIN, C. ; MOL. J. P. S. ; COSTA, F. B.; *et al.* *Brucella ovis* mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. **Plos One**, [s.l.], v. 15, p. e0231893, 2020.

ENRIGHT, F.M.; ARAYA, L.N.; ELZER, P.H.; *et al.* Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v.26, n.2, p.171-182, 1990.

FRANCO, M.P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H. Human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.12, p.775-786, 2007.

GRILLÓ, M.J.; BOSSERAY, N.; BLASCO, J.M. *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. **Biologicals**, [s.l.], v.28, p.119-127, 2000.

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v.90, p.281-297, 2002.

GUÉNET, J.L.; BENAVIDES, F.; PANTHIER, J.J.; *et al.* **Genetics of the Mouse**. Berlin: Springer, 2015.

GOLDING, B.; SCOTT, D.E.; SCHARF, O.; *et al.* Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection**, [s.l.], v.3, n.1, p.43-48, 2001.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD J.P.; *et al.* From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, [s.l.], v.36, n.3, p.313-326, 2005.

GRIFFITHS, K.L.; KHADER, S.A. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. **Current Opinion in Immunology**, [s.l.], v.28, p.58-63, 2014.

HOMES, A.C.; CASARO, A.P.; CAMPERO, C.M. Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria*, v.75, p.302-306, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). *Produção da Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro, v.47, p.1-8, 2019.

JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; ITURRAL, DE M.; ARIAS, M.A.; *et al.* The new strains *Brucella inopinata* BO1 and *Brucella* species 83-210 behave biologically like classic infectious *Brucella* species and cause death in murine models of infection. *Journal of Infectious Diseases*, v.210, n.3, p.467-472, 2014.

JIANG, X.; BALDWIN, C.L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, [s.l.], v.61, n.1, p.124-134, 1993.

KIM, S.; LEE, D.S.; WATANABE, K.; *et al.* Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. **BMC Microbiology**, [s.l.], v.5, n.22, e1471-2180, 2005.

KANG, Y.S.; BROWN, D.A.; KIRBY, J.E. *et al.* *Brucella neotomae* recapitula atributos de doença humana zoonótica em um modelo de infecção murina. **Infection and Immunity**, [s.l.], v.87, 2019.

KO, J.; SPLITTER, G.A. *Brucella abortus* tandem repeated ATP-binding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae* LktB, are not necessary for intracellular survival. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v.29, p.245-253, 2000.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, [s.l.], v.102, n.3, p.122-134, 1994.

MARTIN, N.L.; HANCOCK, R.E.W. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria. In: ADAMS, G. (Ed). **Advances in Brucellosis research**. Texas A&M University Press. College Station, 1990.

MORENO, E.; MORIYÓN, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v.99, p.1-3, 2002.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers Microbiology*, [s.l.], v.5, e00213, 2014.

MORENO, E. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). **FEMS Microbiology Reviews**, [s.l.], v.45, n.1, e045, 2020.

MOL, J.P.S.; FRANÇA, S.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [s.l.], v.19, p.117-126, 2012.

MYERS, D.M.; SINIUK, A. Preliminary report on the development of a diffusion in gel method for the diagnosis of ram epididymitis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v.19, p.335- 337, 1970.

MEGID, J.; MATHIAS, L.A.; ROBLES, C.A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. **The Open Veterinary Science Journal**, [s.l.], v.4, p.119-126, 2010.

MENDONÇA, C.E.D., MUNHOZ, A.D., BEZERRA R.A. et al. *Brucella ovis* em ovinos: soropositividade e fatores de risco. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v.18, p.1-9, 2017.

MARQUES, A.P.R. **Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-Visna e *Brucella ovis* em ovinos no estado de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2006.

MUHAMMED, S.I.; LAUERMAN, L.H.; MESFIN, G.M. Duration of *Brucella ovis* in ewes. **Cornell veterinarian**, [s.l.], v.65, p.221-227, 1975.

NASCIMENTO, E. F. ; SANTOS, R. L. . **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

NOGUEIRA, A.H.C., FERRARI, C.I.L., CURCI, V.C.L.M. Brucelose ovina (*Brucella ovis*). **Pesquisa e Tecnologia**, [s.l.], v.3, p.1-6, 2006.

PEIXOTO, R.M., SANTOS, G.B., AMANSO, E.S. et al. ANTI-Lentivirus, *Brucella abortus* and *B. ovis* antibodies in small ruminants raised in Pernambuco and Bahia. **Revista Caatinga**, [s.l.], v.29, p.507-511, 2016.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LOBO, J.R.; et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v.61, Supl.1, p.1-5, 2009.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E. ; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, [s.l.], v.32, p.105-115, 2013.

RAMOS, A.A., MIES, F.A., SCHENCK, J.A.P. *et al.* Epididimite ovina: Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v.1, n.1, p.211-213, 1996.

RIZZO, H., GREGORY, L., BERALDI, F. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, [s.l.], v.81, p.99-106, 2014.

ROSINHA, G.M.S.; FREITAS, D.A.; MIYOSHI, A.; *et al.* Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. **Infection and Immunity**, [s.l.], v.70; p.5036-5044, 2002.

SANTOS, R.L.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P. Infecção por *Brucella ovis*. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v.47, p.42-56, 2005.

SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M.; PAIXÃO, T.A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v.33, p.759-764, 2013.

SILVA T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; *et al.* Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. **Infection and Immunity**, [s.l.], v.79, p.1706-1717, 2011a.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F.; *et al.* *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v.167, p.546-553, 2013.

SILVA, T.M.A.; MOL, J.P.S.; WINTER, M.G.; *et al.* The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. **Plos One**, [s.l.], v.12, e114532, 2014.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; COSTA, L.F.; *et al.* Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ($\Delta abcBA$) protects against wild type *Brucella ovis* in rams. **Plos One**, [s.l.], v.10, n.8, e0136865, 2015b.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M.A.; *et al.* Protection provided by an encapsulated live attenuated $\Delta abcBA$ strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. **Clinical and Vaccine Immunology**, [s.l.], v.22, n.7, p.789-797, 2015a.

SOARES, C.P.O.; TELES, J.A.A.; SANTOS, A.F. *et al.* Prevalência da *Brucella* spp em humanos. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v.23, n.5, p.919-926, 2015.

SHORR, E. A new technic for staining vaginal smears. III. A single differential stain. **Science**, [s.l.], v.94, p.545-546, 1941.

SCHOLZ, H.C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; *et al.* *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v.60, p.801-808, 2010.

SCHOLZ, H.C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; AL DAHOUK, S.; *et al.* *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v.66, n.5, p.2090-2098, 2016.

SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v.90, p.479-496, 2002.

STEVEN, D.H. Interspecies differences in the structure and function of trophoblast. In: WHITE, A.; LOKE, Y. M. **Biology of trophoblast**. Amsterdam: Elsevier, 1984.

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; FRACE, M.A.; *et al.* Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v.76, n.17, p.5837-5845, 2010a.

TEIXEIRA, L.S.A.; BATISTA, J.F.; SILVA, P.H.F. *et al.* Seroprevalence of ovine brucellosis in the microregion of Teresina, Piauí, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v.87, p.1-6, e0642019, 2020.

TOBIAS, L.; CORDES, D.O.; SCHURIG, G.G. Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. **Veterinary Pathology**, [s.l.], v.30, p.119-129, 1993.

TSOLIS, R.M.; SECHADRI, R.; SANTOS, R.L.; *et al.* Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. **Plos One**, [s.l.], v.4, e5519, 2009.

UGALDE, R.A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. **Microbes and Infection**, [s.l.], v.1, n.14, p.1211- 1219, 1999.

WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; *et al.* *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v.64, p.4120-4128, 2014.

XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; *et al.* Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v.145, p.158-164, 2010.

XAVIER, M.N.; SANT'ANNA, F.M.; SILVA, T.M.A.; *et al.* A comparison of two agar gel immunodiffusion methods and a complement fixation test for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection in experimentally infected rams. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v.63, n.4, p.1016-1021, 2011.

XAVIER, M.N.; WINTER, M.G.; SPEES, A.M.; *et al.* CD4+ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. **Plos Pathogens**, [s.l.], v.9, n.6, e1003454, 2013.