

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

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ADJUVANTES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS À
CANDIDATA VACINAL *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ EM MODELO MURINO DE
INFECÇÃO POR *Brucella ovis*

JEFFERSON BRUNO SOARES OLIVEIRA

BELO HORIZONTE – MG

EV-UFMG

2021

JEFFERSON BRUNO SOARES OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ADJUVANTES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS À
CANDIDATA VACINAL *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ EM MODELO MURINO DE
INFECÇÃO POR *Brucella ovis*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Alves da Paixão

Coorientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

BELO HORIZONTE – MG

EV-UFMG

2021

O48a Oliveira, Jefferson Bruno Soares, 1988-
Avaliação de diferentes adjuvantes poliméricos associados á candidata vacinal *Brucella ovis* $\Delta abcBA$
em modelo murino de infecção por *Brucella ovis*/ Jefferson Bruno Soares Oliveira. -2021.
74 f.:il

Orientadora: Tatiane Alves da Paixão
Coorientador: Renato de Lima Santos

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Patologia Animal.

Bibliografias: f.: 56 a 70.

1. Ovino - Doenças - Teses - 2. Sistema urogenital - Teses - 3. Brucelose em animais – Teses -
4. Patologia animal - Tese - I. Paixão, Tatiane Alves da – II. Santos, Renato de Lima -
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

JEFFERSON BRUNO SOARES OLIVEIRA

Dissertação “AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ADJUVANTES POLIMÉRICOS ASSOCIADOS À CANDIDATA VACINAL *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO POR *BRUCELLA OVIS*” 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 30 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Tatiane Alves da Paixão - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Renato de Lima Santos

Dr.(a). Humberto de Melo Brandão

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



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Alves da Paixão, Professora do Magistério Superior**, em 30/03/2021, às 13:23, 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 **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2021, às 14:00, 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 Patrícia de Carvalho da Silva, Usuário Externo**, em 30/03/2021, às 14:28, 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 **Humberto de Melo Brandão, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 15:09, 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 **0612887** e o código CRC **6ADB54F4**.

Referência: Processo nº 23072.212513/2021-56 SEI nº 0612887

Dedicatória

Dedico este trabalho aos parentes, amigos e colegas que de maneira tão abrupta e inesperada deixaram este mundo. Agradeço-lhes por compartilharem tantos momentos de amizades verdadeiras, ensinamentos sempre com muita alegria e coragem.

“Quem conhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência. Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão. Uma longa caminhada inicia-se com o primeiro passo”

Lao-Tsé

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda proteção, saúde, paz, felicidades, determinação e fé que me fizeram chegar até aqui.

À minha família, especialmente a minha mãe, Jacinta e ao meu pai José (*in memoriam*) por tudo o que me ensinaram e sempre fizeram por mim, ao meu irmão Jamerson e minhas irmãs Jucielle e Julianna, por todo o apoio e momentos felizes que compartilhamos mesmo distante.

À minha esposa Brenda por todos os momentos que passamos, por ser uma pessoa tão forte que me inspira a seguir em frente, por ser companheira e amiga, sempre me apoiando e encorajando a continuar esta caminhada, aos meus filhos Gabriel e Miguel, que apesar da pouca idade são capazes de me ensinar a tornar-me uma pessoa melhor e me fortalecer diante dos novos desafios.

À professora Tatiane Paixão por ter aceitado a me orientar, compartilhado tanto conhecimento, pela confiança, paciência, palavras de incentivo e por ter me guiado durante toda essa caminhada.

Ao professor Renato de Lima por tudo o que me ensinou, por todo o apoio, compreensão, confiança, por ter permitido e contribuído para meu crescimento profissional ao longo desta trajetória.

À Pâmela, grande amiga que tive a oportunidade de conviver durante toda essa trajetória por tudo que me ensinou, pela paciência que sempre teve comigo, em muitos momentos difíceis, por ser uma amiga verdadeira com quem sempre pude contar.

Aos amigos Leonardo, Sóstenes e Matheus por tantos momentos de alegria que compartilhamos, pelo apoio que sempre me deram e as palavras que me impulsionaram a conseguir chegar até aqui.

Aos colegas e amigos do laboratório, Monique, Thaynara, Fabíola, Diego, Camila, Cláudia, Frank, Daniel, Ayisa, Clarissa, Brunno, Heloísia, Laice e Andressa, por compartilharem comigo vários momentos que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente, me auxiliando em experimentos e compartilhando conhecimentos.

À Escola de Veterinária da UFMG pela forma como fui acolhido, lugar onde me foi permitido crescer pessoal e profissionalmente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter me concedido uma bolsa de estudos durante o mestrado.

RESUMO

A Brucelose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas, de grande importância em saúde animal e humana. *Brucella ovis* infecta ovinos causando principalmente epididimite e falha reprodutiva em carneiros. Práticas de vacinação, aliadas a um eficiente programa de vigilância são ferramentas fundamentais para o controle das doenças. Uma alternativa para o controle e erradicação da brucelose ovina por *B. ovis* seria a utilização de estirpes atenuadas desta espécie. Este estudo teve o objetivo de avaliar o potencial vacinal da candidata a vacina *B. ovis* $\Delta abcBA$ associada a diferentes adjuvantes em camundongos desafiados com *B. ovis*. Camundongos imunizados com cápsulas de alginato com quitosana carregadas com a estirpe vacinal apresentaram uma redução significativa na recuperação bacteriana no baço e fígado após o desafio infeccioso quando comparados ao grupo não vacinado, conduzindo há uma diferença de aproximadamente 0,514 Log e 0,598 Log de recuperação bacteriana no baço e fígado, respectivamente. Durante a avaliação dos níveis de IgG os animais imunizados com alginato com quitosana carregadas com a estirpe vacinal exibiram altos níveis de IgG total, exibindo altos níveis dos isotipos IgG1 e IgG2a, ambas responsáveis por auxiliarem na condução de uma resposta imune tanto do tipo humoral quanto celular respectivamente. Este conjunto de resultados obtidos demonstram que *B. ovis* $\Delta abcBA$ associadas a cápsulas de alginato com quitosana protege camundongos contra o desafio experimental com *B. ovis*.

Palavras-chave: alginato, quitosana, matriz polimérica, resposta imune, carneiros, brucelose ovina, transportador ABC, camundongos.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease caused by facultative intracellular Gram-negative bacteria, of great importance in animal and human health. *Brucella ovis* infects sheep mainly causing epididymitis and reproductive failure in sheep. Vaccination practices, combined with an efficient surveillance program, are fundamental tools for disease control. An alternative for the control and eradication of ovine brucellosis by *B. ovis* would be the use of attenuated strains of this species. This study aimed to evaluate the vaccine potential of the candidate for the *B. ovis* $\Delta abcBA$ vaccine associated with different adjuvants in mice challenged with *B. ovis*. Mice immunized with chitosan alginate capsules loaded with the vaccine strain showed a significant reduction in bacterial recovery in the spleen and liver after the infectious challenge when compared to the unvaccinated group, leading to a difference of approximately 0.514 Log and 0.598 Log of bacterial recovery in the spleen and liver, respectively. During the evaluation of IgG levels, animals immunized with chitosan alginate loaded with the vaccine strain exhibited high levels of total IgG, exhibiting high levels of the IgG1 and IgG2a isotypes, both responsible for assisting in the conduction of an immune response, both humoral and cell respectively. This set of results obtained shows that *B. ovis* $\Delta abcBA$ associated with alginate capsules with chitosan protects mice against the experimental challenge with *B. ovis*.

Keywords: alginate, chitosan, polymer matrix, immune response, rams, sheep brucellosis, ABC transporter, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de microscopia de fluorescência demonstrando inúmeras bactérias vermelhas (*B. ovis* $\Delta abcBA$ expressando *mCherry*) associada a cápsulas de alginato com quitosana (A) ou a matriz polimérica (B). 41

Figura 2. Peso de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) avaliado por 42 dias. Camundongos foram imunizados por via subcutânea com PBS (Não imunizados), matriz polimérica (MP), M P + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e *B. ovis* $\Delta abcBA$ + AQ (AQ+ $\Delta abcBA$). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05). 42

Figura 3. Avaliação da espessura da pele no local da inoculação, 14 dias pós imunização (A-E). Lesão cutânea avaliada no dia da eutanásia (42 dias pós-inoculação) (F). Camundongos foram imunizados por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e *B. ovis* $\Delta abcBA$ + AQ (AQ+ $\Delta abcBA$). Não imunizados (A); MP (B), AQ (C), MP+ $\Delta abcBA$ (D) nesses animais é possível observar o discreto aumento da espessura no local da imunização ao contrário do que foi observado no grupo AQ+ $\Delta abcBA$ (E F), onde os animais desenvolveram uma intensa reação local cutânea, com marcado aumento de volume (E), havendo em alguns casos (n=3), área focalmente extensa de ulceração cutânea na região pélvica condizente com o local da inoculação. 43

Figura 4. Espessura da pele no local da inoculação da vacina de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) avaliado por 42 dias. Camundongos foram imunizados por via subcutânea com PBS (Não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato e quitosana (AQ) e *B. ovis* $\Delta abcBA$ + AQ (AQ+ $\Delta abcBA$). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). 44

Figura 5. Apresentação da mediana do escore de lesões histopatológicas encontradas no sítio de inoculação da vacina de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizados por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada por alginato e quitosana (AQ+ $\Delta abcBA$) representadas por círculo preto (A), AQ por triângulo vazio (B), matriz polimérica (MP) + *B. ovis* $\Delta abcBA$

(MP+ $\Delta abcBA$) quadrado vazio (C), MP por triângulo preto invertido (D) e PBS (não imunizados) círculo vazio (E). Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e mediana (F). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 46

Figura 6. Recuperação bacteriana de baço de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizado), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 47

Figura 7. Recuperação bacteriana do fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizados por via subcutânea com PBS (não imunizado), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$). 48

Figura 8. Determinação dos níveis totais de IgM por meio de ELISAI do soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$). 50

Figura 9. Determinação dos níveis totais de IgG por meio de ELISAI do soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os

dados são expressos animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)..... 51

Figura 10. Determinação dos níveis de IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C) e IgG3 (D) por meio de ELISAI do soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). 52

Figura 11. Avaliação histopatológica do baço de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) imunizadas por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada por alginato com quitosana (AQ+ $\Delta abcBA$) representada por círculo preto (A), AQ por triângulo vazio (B), matriz polimérica + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$) quadrado vazio (C), MP por triângulo invertido preto (D) e PBS (não imunizado) círculo vazio (E). Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e a mediana (F). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$)..... 54

Figura 12. Avaliação histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) imunizadas por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada por alginato com quitosana (AQ+ $\Delta abcBA$) representado por círculo preto (A), AQ por triângulo vazio (B), matriz polimérica + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$) quadrado vazio (C), MP por triângulo invertido preto (D) e PBS (não imunizado) círculo vazio (E). Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e a mediana (F). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$)..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes adjuvantes associados a <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ utilizados para imunização dos animais.	36
Tabela 2. Tempo (minutos) de polimerização da matriz polimérica associada a <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ em diferentes concentrações e temperaturas.	40
Tabela 3. Tempo necessário (minutos) para liquefação da matriz polimérica associada a <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ em diferentes concentrações e temperaturas.....	40
Tabela 4. Proteção induzida em baço de camundongos C57BL/6 imunizados com <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$ e experimental mente desafiados com a estirpe selvagem de <i>B. ovis</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de Variância
AQ.....	Alginato com Quitosana
BALT.....	Tecido Linfoide Associado ao Brônquio
BSA.....	Soroalbumina Bovina
CaCl.....	Cloreto de Cálcio
ELISAI.....	Ensaio Imunoenzimático Indireto
EMBRAPA.....	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FC.....	Fixação do complemento
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sufúrico
IFN- γ	Interferon gama
IgG.....	Imunoglobulina G
IgG1.....	Imunoglobulina G1
IgG2a.....	Imunoglobulina G2a
IgG2b.....	Imunoglobulina G2b
IgG3.....	Imunoglobulina G3
IgM.....	Imunoglobulina M
IL-4.....	Interleucina 4
LPS.....	Lipopolissacarídeo
mL.....	Mililitro
MOPS.....	Ácido 3- (N- morfolino) Propanossulfônico
MP.....	Matriz Polimérica
NaCl.....	Cloreto de Sódio
OD ₆₀₀	Densidade Óptica a 600 nanômetros
OPD.....	Dicloridrato de o- fenilenodiamina
PBS.....	Tampão Fosfato-Salino
PBST.....	Solução Fosfato Salina com Tween
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
SST4.....	Sistema de Secreção do Tipo 4
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	Linfócito T CD8 ⁺
TNF.....	Fator de Necrose Tumoral
TSA.....	Ágar Triptona de Soja
UFC.....	Unidades Formadoras de Colônias
VCB.....	Vacúolo Contendo <i>Brucella</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. O gênero <i>Brucella</i>	18
3.2. Infecção por <i>Brucella ovis</i>	20
3.2.1 Epidemiologia.....	20
3.2.2. Manifestações clínicas.....	22
3.2.3 Lesões macro e microscópicas	23
3.2.4 Patogênese.....	24
3.2.5 Métodos de diagnósticos	25
3.3. Controle e Profilaxia da infecção por <i>B. ovis</i>	26
3.4. Sistema transportador ABC de <i>B. ovis</i>	27
3.5 Adjuvantes vacinais	29
3.6. Uso de adjuvantes em vacinas contra brucelose.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Declarações de ética.	33
4.2 Estirpes bacterianas e condições de cultivo.....	33
4.3. Avaliação da estabilidade da matriz polimérica.....	34
4.4. Preparo da vacina com matriz polimérica.....	35
4.5. Preparo das vacinas com alginato e quitosana.....	35
4.6. Imunização dos camundongos.	35
4.7. Ensaio de proteção.....	36
4.8. Isolamento bacteriano.	37
4.9. Avaliação histopatológica.....	37
4.10. Microscopia de fluorescência.....	37
4.11. Avaliação da resposta imune humoral.....	38
4.12 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 A matriz polimérica apresentou viabilidade de seu uso como adjuvante em condições ambientais.	39
5.2 Aspecto microscópico das formulações vacinais.	41

O aspecto microscópico das formulações vacinais foi avaliado por meio de microscopia de fluorescência utilizando a estirpe *B. ovis* $\Delta abcBA$ *mCherry* associada aos adjuvantes. Ambos demonstram bactérias retidas em seu interior e amplamente distribuídas. As cápsulas de AQ

apresentaram formatos ovoides irregulares, com tamanho variando entre 500 µm e 900 µm. A avaliação da MP revelou um material amorfo associado a bactérias difusamente distribuídas (Figura 1).	41
5.3 A estirpe vacinal <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato com quitosana incitam uma resposta inflamatória intensa e duradoura no local da inoculação.	41
5.4 A vacinação com da estirpe <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato e quitosana conferiu proteção contra o desafio com estirpe selvagem de <i>B. ovis</i>.	47
5.5 A imunização com <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato e quitosana induz a uma forte resposta imune humoral em camundongos desafiados com estirpe selvagem de <i>B. ovis</i>.	49
5.6 A vacinação com estirpe mutante encapsulada por alginato e quitosana reduz as lesões inflamatórias no baço e fígado de camundongos infectados por estirpe selvagem de <i>Brucella ovis</i>.	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais doenças de grande importância tanto para a saúde animal quanto humana são as causadas por bactérias do gênero *Brucella*. Esta bactéria Gram-negativa intracelular facultativa amplamente difundida mundialmente é capaz de infectar diferentes espécies de animais, embora, algumas espécies tenham hospedeiro específico, elas possam ainda infectar outras espécies animais e seres humanos (Corbel e Brinley-Morgan, 1984; Foster et al., 2007; Scholz et al., 2010; Whatmore et al., 2014; Scholz et al., 2016).

Dentre as espécies deste gênero, *Brucella ovis* apesar de não ser zoonótica é responsável por grandes perdas econômicas em criações de ovinos em todo o mundo, relacionada principalmente a epididimite e falhas reprodutivas, sendo em grande parte dos casos uma doença negligenciada (Burgess, 1982; Carvalho Júnior, et al., 2012).

A brucelose ovina por *B. ovis* apresenta-se distribuída por todo o mundo, afetando em especial as regiões onde a criação de ovinos é considerada uma atividade econômica de grande relevância, podendo ser encontrado em países das Américas, Ásia, Europa, África e Oceania (Hopkinson et al., 1979; Ridler et al., 2000; Picard-Hagen et al., 2015; Costa et al., 2016; Ledwaba et al., 2019; Elderbrook et al., 2019; Ali et al., 2019; Alvarez et al., 2020). Graças a estudos sorológicos realizados no Brasil, é possível observar a distribuição desta doença por diferentes Estados e regiões, principalmente naqueles onde a criação de ovinos é de grande importância econômica (Costa et al., 2012; Santos et al., 2013b; Costa et al., 2016; Mendonça et al., 2017), assim como em outros países, onde se observam redução da produtividade com reflexo financeiro negativo nesta atividade (Elderbrook et al., 2019).

A infecção dos animais ocorre principalmente de forma venérea, por meio do contato entre mucosas, sejam elas prepucial, peniana, retal ou nasal, ou ainda, através do contato com secreções oriundas de animais infectados (Burgess, 1982). Esta doença acomete principalmente carneiros, que desenvolvem lesões em sua grande maioria restritas ao sistema reprodutor (Carvalho Júnior et al., 2012). Dentre os órgãos mais afetados estão o epidídimo, em especial a cauda epididimária, onde se observa intenso infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário, além de afetar também a vesícula seminal e os testículos (Carvalho Júnior et al., 2012; Picard-Hagen et al., 2015; Ali et al., 2019). As ovelhas apesar de serem afetadas de forma esporádica, podem apresentar sinais clínicos relacionados a falhas reprodutivas como, aborto, nascimento de crias fracas e natimortalidade (Homse et al., 1994; Grilló et al., 1999).

Para se chegar ao diagnóstico da brucelose ovina por *B. ovis* é possível lançar mão de técnicas diagnósticas como métodos sorológicos como Imunodifusão em Gel de Ágar

(IDGA), ELISAI (do inglês Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, indireto) (França et al., 2014; Picard-Hagen et al., 2015) e o teste de fixação do complemento (FC) (West et al., 1993; Xavier et al., 2011), bem como métodos moleculares como PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) (Costa et al., 2016), ou ainda através do isolamento bacteriano, sendo esta técnica apontada como padrão ouro para o diagnóstico desta infecção (Silva et al., 2015b; Branscom et al., 2019).

Uma das formas de se obter sucesso no controle de uma enfermidade é aliar um programa de vigilância eficiente a práticas de vacinação (Olsen e Stoffregen, 2005; Dorneles et al., 2015). Outra espécie deste gênero que pode acometer os ovinos é *B. melitensis*, sendo seu controle realizado a partir da imunização dos animais utilizando uma estirpe viva atenuada denominada *B. melitensis* Rev 1 (Ridler e West, 2011; Sancho et al., 2014). Embora muito utilizada e demonstre certa proteção contra a infecção por *B. ovis* (Blasco, 1997), seu uso apresenta certas desvantagens como, resistência antimicrobiana a estreptomicina, capacidade de indução de abortos em animais gestantes, interferência em métodos diagnósticos (Marín et al., 1990; Blasco, 1997; Ponsart et al., 2020), além de ser patogênica para seres humanos (Arapović et al., 2020). A comercialização desta vacina não é permitida em países onde a ocorrência *B. melitensis* é considerada exótica (Blasco, 1997; Grilló et al., 2000; Ridler e West, 2011).

De forma alternativa, o controle e erradicação da infecção por *B. ovis*, pode ser alcançado por meio de vacinas que utilizassem estirpes atenuadas desta espécie. Estudos demonstraram que a utilização da estirpe atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi capaz de conferir proteção significativa em carneiros desafiados experimentalmente com a estirpe selvagem de *B. ovis*, demonstrando ainda melhor resposta quando associada a adjuvantes (Silva et al., 2015b).

A utilização de substâncias denominadas de adjuvantes, em preparações vacinais, pode contribuir para o aumento da resposta imune, conduzindo a uma resposta mais intensa e prolongada, melhorando a eficácia de uma vacina (Brunner et al., 2010). De acordo com alguns autores, para estas substâncias serem consideradas ideais, elas devem apresentar algumas características dentre as quais, atuarem de forma conjunta e permitir melhor captação de antígenos por células do sistema imune, ter estabilidade, serem considerados puros e seguros, além de versáteis quanto a seu uso por diferentes vias de imunização e produzidos de forma sustentável e sintética, contribuindo para melhora da resposta imune e redução no número de imunizações (Reed et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Considerando a hipótese de que vacinas preparadas a partir de estirpe *B. ovis* $\Delta abcBA$ associada a diferentes formulações adjuvantes, conferem maior proteção contra o desafio infeccioso com a estirpe selvagem, este trabalho tem como objetivo geral, avaliar o potencial vacinal da candidata a vacina *B. ovis* $\Delta abcBA$ associada a diferentes adjuvantes em camundongos desafiados com *B. ovis*.

Para que este objetivo pudesse ser alcançado, uma série de experimentos foi realizada, destacando assim os seguintes objetivos específicos:

- i. Analisar o tempo de polimerização *in vitro* da matriz polimérica em diferentes concentrações e temperaturas.
- ii. Avaliar a capacidade protetora da estirpe vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$ associada a diferentes adjuvantes incluindo matriz polimérica e microcápsulas de alginato e quitosana.
- iii. Avaliar reações vacinais nos locais de inoculação da estirpe vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$ associada a diferentes adjuvantes.
- iv. Avaliar os níveis de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) induzidos pelas diferentes associações de adjuvantes a vacina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O gênero *Brucella*

A brucelose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas, de grande importância em saúde animal e humana. A primeira descrição de bactérias deste gênero ocorreu no ano de 1887 por David Bruce, isolada de soldados acometidos pela doença conhecida como febre de Malta (Bruce, 1887).

Atualmente doze espécies são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* (Corbel e Brinley-Morgan, 1984), *B. pinnipedialis* (Foster et al., 2007), *B. ceti* (Foster et al., 2007), *B. microti* (Scholz et al., 2008), *B. inopinata* (Scholz et al., 2010), *B. papionis* (Whatmore et al., 2014) e *B. vulpis* (Scholz et al., 2016).

Estas bactérias apresentam características peculiares a sua sobrevivência, como a capacidade de permanecer e se replicar no interior de células fagocíticas como macrófagos, células trofoblásticas e células dendríticas, mais precisamente no retículo endoplasmático,

sendo capaz de modular a formação do fagolisossoma, permitindo desta forma sua permanência no interior das células hospedeiras (Gorvel e Moreno, 2002; Moreno, 2014). Também tem sido descrito a habilidade destas bactérias em se multiplicarem em diferentes tipos celulares como fibroblastos embrionários de camundongos (Hamer et al., 2014), micróglias, que quando infectadas favorecem a injúria neuronal (Rodríguez et al., 2017) e mais recentemente, pré-adipócitos, levando a importantes alterações durante o processo de adipogênese (Viglietti et al., 2020).

Algumas espécies de *Brucella* como *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* apresentam caráter zoonótico e são descritas como causadoras de doenças graves em seres humanos em diversas regiões do mundo, ocorrendo em algumas destas de forma endêmica (Pappas et al., 2005; Pappas et al., 2006). Em seres humanos os sinais clínicos são muito variáveis e podem acometer diversos órgãos como fígado, sistema nervoso central, articulações, coração, mediastino e sistema reprodutor, sendo consideradas febre, dores articulares, astenia e suores noturnos as principais manifestações clínicas (Sabzi et al., 2017; Ebrahimpour et al., 2017; Sabzi e Faraji, 2017; Casallas et al., 2018; Bosilkovski et al., 2018; Handattu et al., 2018; Inan et al., 2019).

A brucelose afeta ampla variedade de animais domésticos e silvestres. Em bovinos, a infecção por *B. abortus* pode causar perdas econômicas significativas relacionadas à falha na reprodução e queda na produtividade, sendo a brucelose bovina apontada como importante causa de aborto em bovinos e diagnosticada em diversas regiões do mundo (Carvalho et al., 2016; Gwida et al., 2016; El-Diasty et al., 2016; Hernández-Mora et al., 2017; Higuera et al., 2018). Bovinos infectados por *B. abortus* podem permanecer sem sintomatologia clínica aparente ou manifestar aborto que geralmente ocorre no último trimestre de gestação associada a uma placentite hemorrágica ou fibrino-necrótica (Xavier et al., 2009; Poester et al., 2013). De acordo com (Santos et al., 2013a) uma única vaca acometida pode representar um prejuízo que varia entre R\$ 226,47 a R\$ 420,12 (com base em valores da época) havendo assim, perdas milionárias para o setor pecuário, podendo desta forma comprometer a atividade, demonstrando a importância de se possuir um rebanho bovino livre de brucelose (Allen et al., 2015).

Outras espécies de *Brucella* também causam prejuízos econômicos em criações no mundo todo. *Brucella melitensis* é o principal agente da brucelose em pequenos ruminantes, sendo também a espécie zoonótica mais patogênica ao homem (Papas et al., 2005; Blasco e Molina-Flores, 2011). Infecção por *B. ovis* causa epididimite e falha reprodutiva em carneiros, e embora amplamente distribuída, é geralmente negligenciada (Carvalho Júnior

et al., 2012). *B. canis* infecta cães sendo responsável por infecções crônicas assintomáticas de diagnóstico desafiador ou associadas a falhas reprodutivas e natimortalidade (Souza et al., 2018).

Devido a sua característica intracelular, o controle da infecção por *Brucella* spp. é prejudicada, haja vista que, este agente se abriga em células hospedeiras não permanecendo exposto aos efeitos da maioria dos antibióticos (Gorvel e Moreno, 2002). Outra complicação importante para o tratamento de infecções por *Brucella* spp. é sua resistência antimicrobiana, havendo necessidade de combinação de fármacos, especialmente doxiciclina e rifampicina, associadas a um longo período de tratamento a depender da apresentação clínica, estirpe envolvida e das complicações exibidas pelo paciente (Shehabi et al., 1990; Pappas et al., 2005; Pappas et al., 2006; Corbel, 2006).

Uma forma eficiente de prevenir a doença do homem é controlar a brucelose nos animais domésticos. Com intuito de prevenir a brucelose em animais especialmente pequenos e grandes ruminantes, os programas de controle têm como principal ferramenta a vacinação (Olsen e Stoffregen, 2005). Atualmente as vacinas em uso para prevenção da brucelose animal são oriundas de cepas vivas atenuadas, sendo as mais amplamente utilizadas comercialmente *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51, esta última sendo uma estirpe rugosa (Corbel, 2006; Dorneles et al., 2015; Carvalho et al., 2016). No entanto, o uso destas vacinas apresenta particularidades e limitações, como por exemplo a idade do animal a ser vacinada, vacinação apenas de fêmeas, risco de infecção ao animal, podendo ocasionar abortamento em fêmeas gestantes vacinadas, interferência em testes sorológicos, ser eliminada através do leite, apresentar resistentes à rifampicina, além de acarretar doença em humanos devido a inoculação acidental (Dougherty et al., 2013; Dorneles et al., 2015; Gruber et al., 2020; Arapović et al., 2020).

3.2. Infecção por *Brucella ovis*

3.2.1 Epidemiologia

B. ovis é uma das doze espécies reconhecidas no gênero *Brucella*. Este cocobacilo Gram-negativo é capaz de sobreviver no interior de células fagocíticas, não tem encapsula e apresenta um fenótipo rugoso devido à ausência da cadeia O no lipopolissacarídeo (LPS). Esta espécie é responsável por infecção crônica especialmente em ovinos (Burgess, 1982), havendo relatos de infecção em cervos (Ridler et al., 2000) e em caprinos que convivem com ovinos que estão eliminando a bactéria (Burgess et al., 1985). Cabe ressaltar que este

agente não apresenta patogenicidade conhecida para seres humanos (Burgess, 1982; Godfroid et al., 2005).

A brucelose ovina por *B. ovis* apresenta ampla distribuição mundial, acometendo regiões onde a criação de ovinos apresenta conhecida relevância econômica, dentre os quais estão países da América do Norte e do Sul, Europa, África, Ásia, além de Nova Zelândia e Austrália (Hopkinson et al., 1979; Ridler et al., 2000; Picard-Hagen et al., 2015; Costa et al., 2016; Ledwaba et al., 2019; Elderbrook et al., 2019; Ali et al., 2019; Alvarez et al., 2020).

No Brasil estudos sorológicos têm evidenciado brucelose ovina em rebanhos de diferentes Estados. Em um estudo realizado na Paraíba, 20,4% das propriedades avaliadas apresentam animais sorologicamente positivos (Santos et al., 2013b). Em estudo realizado por Costa et al., (2012) no Piauí utilizando-se métodos sorológicos e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) identificou 12,9% dos rebanhos avaliados positivos para infecção por *B. ovis*. Em Sergipe, Mendonça et al., (2017) observaram uma positividade em testes sorológicos de 46,3% de todas as propriedades avaliadas. No Estado de Minas Gerais, observou-se em propriedades de criação de ovinos e de criação mista de ovinos e caprinos, positividade de 19,5% e 61,1% respectivamente pelo método de ELISA indireto e a 4% e 0%, respectivamente em PCR de amostra de urina. (Costa et al., 2016).

De acordo com alguns autores, a infecção por *B. ovis* resulta importante prejuízo econômico, sendo mais representativo em sistemas de criação intensiva. Alguns fatores podem contribuir para uma maior prevalência e maior risco de infecção como descrito por os Elderbrook et al., (2019), onde o sistema de criação semi-intensivo, utilizando uma proporção de 1 macho para 41,3 fêmeas, considerada adequado para este tipo de sistema (Fonseca et al., 2005), além da rotatividade do plantel com a frequente aquisição de animais novos, oriundos de rebanhos não testados podem contribuir para um aumento dos casos de brucelose ovina. Além destes fatores, animais a partir de um ano de idade, devido ao início da vida reprodutiva, podem apresentar maior tempo de exposição ao agente (Sergeant, 1994; Machado et al., 2015; Alvarez et al., 2020).

De forma natural acredita-se que a infecção ocorra de um animal a outro por transmissão venérea, pelo conato entre mucosas (prepuccial, peniana, nasal e retal) ou ainda pelo contato com secreções de animais contaminados (Burgess, 1982). Experimentalmente para se reproduzir a infecção por *B. ovis* foram utilizadas a via intraprepuccial e intraconjuntival em ovinos domésticos (Xavier et al., 2010; Carvalho Júnior et al., 2012; Silva et al., 2013) e em ovinos selvagens como *Ovis canadensis canadensis* (McCollum et

al., 2013). Trinta dias após a inoculação já é possível observar sinais clínicos como aumento de volume na cauda do epidídimo, relacionada ao processo inflamatório estabelecido, sendo possível observar a eliminação das bactérias no sêmen antes da observação deste sinal (Carvalho Júnior et al., 2012).

3.2.2. Manifestações clínicas

Em carneiros infectados por *B. ovis* as lesões em sua maioria estão restritas ao sistema reprodutor. A região mais acometida é a cauda do epidídimo, sendo observado aumento de volume assimétrico e alterações na consistência, apresentando-se firme a palpação durante exame clínico (Carvalho Júnior et al., 2012; Picard-Hagen et al., 2015; Ali et al., 2019). Esta lesão pode se estender e afetar os testículos, que podem ter apresentação clínica caracterizada por diminuição do volume e flacidez devido a degeneração, refletindo em diminuição da circunferência escrotal (Petrović et al., 2014; Picard-Hagen et al., 2015; Ali et al., 2019).

Ainda durante a avaliação clínica é possível observar a presença de formações nodulares, que por meio de exame de imagem, permite caracterizar como formação de abscessos que podem ser observados tanto no epidídimo quanto no testículo (Carvalho Júnior et al., 2012; Ali et al., 2019). Outro órgão afetado é a glândula vesicular, no entanto, a evidencia de alterações clínicas dificilmente é observada durante um exame clínico (Foster et al., 1987).

Apesar do comportamento sexual normal, a qualidade do sêmen em carneiros infectados por *B. ovis* podem estar comprometida. As principais alterações observadas estão relacionadas a morfologia espermática, sendo a maior relacionadas a peça intermediária, no entanto, alterações morfológicas na cauda podem também estar presentes, além de células inflamatórias e diminuição na concentração espermática que podem ser observadas durante a avaliação do ejaculado (Carvalho Júnior et al., 2012; Picard-Hagen et al., 2015).

Em ovelhas, embora sejam ocasionais, as principais manifestações clínicas observadas estão relacionadas ao abortamento, natimortalidade e nascimento de crias fracas, vaginite e endometrite, com eliminação bacteriana através de descargas vaginais, sendo estas alterações diretamente relacionadas a falhas reprodutivas, comprometendo o índice reprodutivo do rebanho (Homse et al., 1994; Grilló et al., 1999). Outro ponto importante é a observação de alterações inflamatórias na glândula mamária, com a

eliminação de bactérias através do leite, contribuindo desta forma para a transmissão da doença (Grilló et al., 1999).

3.2.3 Lesões macro e microscópicas

Durante a infecção por *B. ovis* em machos as lesões concentram-se principalmente no aparelho reprodutor, em especial acometendo o epidídimo, glândula vesicular e em alguns casos os testículos. Macroscopicamente, o epidídimo pode apresentar principalmente na região da cauda um aumento de volume de aspecto nodular de consistência firme e em alguns casos ao corte drenar conteúdo de aspecto viscoso e amarelado. Os testículos podem apresentar-se diminuídos de volume e consistência flácida indicando degeneração testicular, além da formação de cápsula fibrosa em casos crônicos resultando em aderências das túnicas (Carvalho Júnior et al., 2012; Silva et al., 2015b).

Microscopicamente, no epidídimo a lesão é caracterizada a princípio por intenso infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário, podendo variar em intensidade e acometer ambos os testículos. Isso ocorre devido a estase espermática, conduzindo assim a posterior ruptura tubular, levando a formação de granuloma espermático (Carvalho Júnior et al., 2012). Este extravasamento induz uma resposta imune contra os espermatozoides dando início a um processo inflamatório intersticial granulomatoso. Nos testículos as lesões observadas são características de degeneração com vacuolização e desprendimento das células do epitélio seminífero em conjunto com dilatação tubular seminífera (Carvalho Júnior et al., 2012; Silva et al., 2015b). Outro órgão comumente afetado é a vesícula seminal sendo observado em muitos casos infiltrado inflamatório intersticial multifocal composto por linfócitos e plasmócitos (Carvalho Júnior et al., 2012).

Em fêmeas infectadas por *B. ovis* os principais achados são vaginite, endometrite e placentite, embora, a bactéria possa ser isolada de outros órgãos sem alterações patológicas significativas (Grilló et al., 1999; Santos et al., 2005). Microscopicamente, as lesões caracterizam-se por endometrite linfoplasmocitária multifocal associada a hiperplasia epitelial com formação de dilatações císticas (Grilló et al., 1999; McCollum et al., 2013). As lesões na placenta ocorrem principalmente na região intercotiledonária com infiltrado inflamatório composto por histiócitos e neutrófilos, com necrose de células trofoblásticas (Osburn e Kennedy, 1966; McCollum et al., 2013).

Em fetos abortados devido a infecção por *B. ovis* as lesões estão relacionadas a processos pneumônicos. Microscopicamente, composto por infiltrado inflamatório intersticial linfo-histioplasmocitário, associado a edema de septo alveolar e hiperplasia do

tecido linfóide associado ao brônquio (BALT), colapso dos espaços alveolares, além de inflamação de linfonodos mediastinais (Osburn e Kennedy, 1966; Burgess, 1982; McCollum et al., 2013).

3.2.4 Patogênese

A via de infecção por *B. ovis* em ovinos pode ocorrer através do contato com superfícies mucosas, seja ela peniana, vaginal, retal, nasal ou conjuntival (Burgess, 1982). Após atravessar a barreira mucosa, as bactérias são fagocitadas por células fagocíticas profissionais (macrófagos e células dendríticas) ou ainda invadem células não fagocíticas. No interior destas células estes microrganismos são carregados para linfonodos regionais e destes para diversos órgãos como, baço, fígado, rins e principalmente para o sistema reprodutor, onde passam a ser eliminados através do sêmen e urina, a partir da quarta semana pós infecção (Silva et al., 2013; Silva et al., 2015b).

Após sua entrada na célula hospedeira estas bactérias ficam retidas em um compartimento conhecido como vacúolo contendo *Brucella* (VCB), onde estas podem sobreviver e se multiplicar. Grande parte das bactérias é eliminada no interior de macrófagos por meio da fusão do fagossomo com o lisossomo, antes mesmo das bactérias alcançarem seu sítio de multiplicação (Gorvel e Moreno 2002; Celli et al., 2003).

Para isto estes agentes produzem moléculas importantes para sua sobrevivência no hospedeiro, denominados fatores de virulência, como o sistema de secreção do tipo 4 (SST4), um complexo de proteínas da membrana externa que participam do transporte de substâncias para o exterior da célula, sendo responsável pela maturação do VCB, impedindo a formação do fagolisossomo, favorecendo a chegada da bactéria ao seu sítio de multiplicação (O' Callaghan et al., 1999; Celli et al., 2003).

Existem diversos outros fatores de virulência identificados no gênero *Brucella* como LPS, um componente importante da membrana externa bacteriana que tem em sua composição lipoproteína A e algumas espécies de *Brucella*, que apresentam morfologia lisa possuem ainda a cadeia O de polissacarídeo, diferindo das espécies de aspecto rugoso como *B. ovis* e *B. canis*, sendo que este aspecto pode influenciar na sobrevivência bacteriana intracelular (Godfroid et al., 2000; Gorvel e Moreno, 2002). O sistema regulatório de dois componentes BvrR/BvrS, que atuam regulando genes que codificam proteínas da membrana externa (López-Goñi et al., 2002). Há ainda enzimas que atuam como fatores de virulência por exemplo superóxido dismutase e catalase, enzimas que atuam inibindo a ação de radicais livres produzidos no interior de macrófagos (Gee et al., 2005; Glowacka et

al., 2018). O sistema transportador ABC também é considerado um fator de virulência no gênero *Brucella*. As suas funções foram desvendadas através de mutagênese e deleção de genes relacionados a sua regulação ou síntese, estando especialmente envolvidos na importação de aminoácidos, íons, peptídeos, ferro e sulfato, e na exportação de toxinas, ácidos graxos e antibióticos pela bactéria (Ko e Splitter, 2000; Silva et al., 2011).

3.2.5 Métodos de diagnósticos

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* em ovinos, pode ser realizado por diferentes técnicas. Dentre estes estão os testes sorológicos preconizados, destacando-se o ELISAI (França et al., 2014; Picard-Hagen et al., 2015), o teste de fixação do complemento (FC) e a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (West et al., 1993; Xavier et al., 2011).

O diagnóstico da brucelose ovina através da avaliação sorológica por meio do ELISAI tem se mostrado bastante importante, permitindo em muitos casos reconhecer animais assintomáticos que podem permanecer no rebanho e servir como fonte de infecção para os demais (Branscom et al., 2019; Elderbrook et al., 2020). Embora este teste apresente sensibilidade e especificidade variável, pode ser utilizado como um teste confiável na triagem de animais, principalmente devido ao fato da ocorrência de reação cruzada com outros patógenos, possibilitando desta forma seu uso nos programas de controle da brucelose ovina (França et al., 2014; Picard-Hagen et al., 2015; Bonfini et al., 2018).

O teste de FC apesar de ser considerado específico para detecção da infecção por *B. ovis*, apresenta algumas desvantagens, dentre elas está a execução complexa desta técnica, havendo necessidade da inativação do soro, alta variabilidade dos resultados, podendo haver, tanto falsos positivos, quanto negativos, com maior interferência em casos crônicos (Ris, 1974; West et al., 1993).

As técnicas de biologia molecular como a PCR vêm ganhando cada vez mais espaço como ferramenta diagnóstica para a brucelose, possibilitando utilizar amostras como sêmen e urina para realização destes testes (Costa et al., 2016). Estas técnicas apresentam vantagens frente a outros métodos por apresentarem especificidade elevada, menor tempo despendido para conclusão do diagnóstico, por permitirem ainda diferenciar entre espécies de *Brucella*. Fato importante considerando que a infecção por *B. melitensis*, espécie mais patogênica e zoonótica do gênero, ocorre em diversas regiões do mundo, mas não no Brasil, acometendo pequenos ruminantes, sendo um diferencial importante para a infecção por *B. ovis* (Xavier et al., 2010; De Massis et al., 2019; Alvarez et al., 2020). Estudos têm

demonstrado que uma associação entre o uso de técnicas de biologia molecular como PCR e métodos sorológicos no diagnóstico da brucelose ovina, possibilitam desta forma um diagnóstico mais rápido e confiável (Xavier et al., 2010; Costa et al., 2016; Branscom et al., 2019).

O isolamento bacteriano é considerado o teste definitivo para o diagnóstico de infecção por *B. ovis*. Este pode ser realizado a partir de amostras de sêmen ou de fragmentos de tecidos do sistema reprodutor em especial epidídimo e glândula vesicular, bem como fragmentos de linfonodos regionais, coletados por biópsia ou mesmo durante exame post-mortem (Silva et al., 2015b; Branscom et al., 2019). Entretanto, para tal, é necessário a utilização de meio de cultivo seletivo próprio para o crescimento de *B. ovis*, conhecido como meio de Thayer-Martin modificado (Silva et al., 2015b). Este método permite distinguir a infecção por *B. ovis* de outros agentes responsáveis por causar epididimite ovina como *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni* e *Trueperella pyogenes*, bem como de agentes comumente isolados de linfonodos como em infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Saunders et al., 2007; Moustakas et al., 2014; Branscom et al., 2019).

3.3. Controle e Profilaxia da infecção por *B. ovis*

Para se obter êxito na erradicação de doenças infecciosas em um rebanho, medidas importantes como vacinação, aliados a um eficiente programa de vigilância são ferramentas fundamentais (Olsen e Stoffregen, 2005; Dorneles et al., 2015). A estirpe bacteriana atenuada *B. melitensis* Rev 1 é amplamente utilizada na imunização de caprinos e ovinos em diversa regiões do mundo contra a infecção por *B. melitensis* (Ridler e West, 2011; Sancho et al., 2014). Contudo, esta estirpe vacinal também demonstrou conferir proteção contra a infecção por *B. ovis* (Blasco, 1997). Embora com seu uso seja possível diminuir a incidência de brucelose ovina no rebanho, a sua total erradicação pode não ser alcançada (Ridler e West, 2011).

Uma das características para se considerar uma vacina ideal no controle da infecção por *Brucella* é ela ser viva atenuada com a capacidade de incitar uma forte resposta imune do tipo celular intensa e prolongada, permitir sua fácil aplicação, não conduzir em fêmeas gestantes quadros de aborto, além destas características, esta vacina deve ainda, ser não patogênica para seres humanos, não interferir com testes diagnósticos, e apresentar baixo custo de produção (Ko e Splitter, 2003; Olsen e Stoffregen, 2005; Dorneles et al., 2015).

Apesar de *B. melitensis* Rev 1 ser amplamente utilizada, seu uso apresenta algumas desvantagens, como resistência antimicrobiana em especial a estreptomicina, indução de abortos em animais gestantes, potencial patogênico para seres humanos (Arapović et al., 2020), ser eliminada no ambiente pós-vacinação, podendo servir como fonte de infecção para outros animais e ao homem, além de interferir em testes diagnósticos (Marín et al., 1990; Blasco, 1997; Ponsart et al., 2020). Além disso, o uso desta vacina não é permitido em países onde a ocorrência *B. melitensis* é considerada exótica, como no Brasil (Blasco, 1997; Grilló et al., 2000; Ridler e West, 2011).

Uma alternativa para o controle e erradicação da brucelose ovina por *B. ovis* seria a utilização de estirpes atenuadas desta espécie. Estudos experimentais demonstraram que a estirpe atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi capaz de conferir proteção contra infecção por *B. ovis* tanto em camundongos (Silva et al., 2015a) quanto em carneiros (Silva et al., 2015b). Outras estirpes mutantes têm sido avaliadas quanto a capacidade protetora durante a infecção por *B. ovis*, como no trabalho realizado por Soler-Lloréns et al., (2014) utilizando estirpes que apresentavam alterações em seu LPS denominados de *B. ovis* $\Delta wadB$ e *B. ovis* $\Delta wadC$, que foram capazes de conferir em camundongos, através inoculação intraperitoneal, proteção contra o desafio infeccioso utilizando a estirpe selvagem de *B. ovis*. Estirpes mutantes com deleções envolvendo proteínas de membrana externa (*B. ovis* $\Delta omp25d$ e *B. ovis* $\Delta omp22$) foram avaliadas em modelo murino quanto a infecção por *B. ovis*, e demonstraram induzir a produção de citocinas importantes envolvidas na resposta imune contra *Brucella* com níveis consideráveis de IFN- γ e TNF- α , bem como induzir a resposta imune humoral com a síntese de imunoglobulinas G destacando suas subclasses IgG1 e IgG2a (Sancho et al., 2014).

3.4. Sistema transportador ABC de *B. ovis*

Sistemas transportadores do tipo ABC estão presentes nas bactérias do gênero *Brucella* e têm sido considerados importantes fatores de virulência (Jenner et al., 2009; Silva et al., 2011). Este sistema é composto por proteínas que estão envolvidas no transporte transmembrânico ativo da bactéria como importação de aminoácidos, peptídeos, íons, ferro e sulfato, bem como exportação toxinas, antibióticos e ácidos graxos (Ko e Splitter et al., 2000; Rosinha et al., 2002; Jenner et al., 2009; Silva et al., 2011).

Embora exista grande quantidade de diferentes sistemas transportadores no genoma de bactérias do gênero *Brucella*, grande parte destes é caracterizada como pseudogenes em *B. ovis* (Jenner et al., 2009). *Brucella ovis* apresenta em seu genoma, um local exclusivo

que apresentam genes responsáveis por codificarem o sistema transportador do tipo ABC importantes para sua patogenicidade, sendo que este local foi denominado de Ilha-1 de patogenicidade de *B. ovis* (BOPI-1 – *B. ovis* pathogenicity island 1) (Silva et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que a deleção de genes envolvidos na codificação do sistema transportador ABC de *B. ovis* é capaz de gerar estirpes atenuadas, interferindo na sobrevivência *in vitro* e *in vivo*, tanto em modelo murino quanto no hospedeiro natural (Silva et al., 2011; Macêdo et al., 2015; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). Uma estirpe mutante de *B. ovis* com a deleção de dois genes em um loco específico denominado *abcEDCBA*, foi denominada de $\Delta abcBA$. Até o momento, não foi demonstrado a deficiência de transporte adquirido pela *B. ovis* $\Delta abcBA$, contudo esta estirpe apresenta deficiência na expressão de proteínas do SST-4, fazendo com que desta forma o vacúolo contendo *Brucella* seja incapaz de tornar-se maduro, não havendo assim a evasão bacteriana do fagolisossomo, prejudicando sobremaneira a multiplicação e sobrevivência intracelular desta bactéria (Silva et al., 2011; Silva et al., 2014; Macêdo et al., 2015).

Diante do reconhecimento da atenuação da estirpe bacteriana *B. ovis* $\Delta abcBA$ estudos foram realizados para avaliar seu potencial como vacina contra a infecção por *B. ovis* (Silva et al., 2011; Silva et al., 2015a). No modelo murino a imunização com *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato demonstrou capacidade protetora contra infecção por *B. ovis*, *B. canis* e *B. melitensis* (Silva et al., 2015b; Eckstein et al., 2020; Costa et al., 2020), levando a redução no número de bactérias recuperadas do baço e fígado. A estirpe exibe ainda baixa persistência no organismo, não sendo recuperada de órgãos como baço, fígado e sistema reprodutor um dia pós inoculação intraperitoneal, demonstrando outra característica importante que é o de não causar lesões em nenhum destes órgãos (Silva et al., 2011).

Após demonstrar resultados promissores a candidata vacinal no modelo murino, seu uso no hospedeiro natural foi avaliado. Em estudo realizado por Silva et al., (2015b), carneiros vacinados com *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato, não eliminaram a estirpe vacinal através do sêmen e urina a partir de 24 horas pós-vacinação, bem como não foi detectada por isolamento ou PCR em amostras de tecidos. Estes animais apresentaram ainda resposta imunológica tanto celular quanto humoral frente a vacina exibindo níveis significativos de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além da soroconversão em testes sorológicos.

Estes dados demonstraram a viabilidade desta estirpe vacinal como promissora candidata a vacina contra a infecção por *B. ovis*, sempre associada ao encapsulamento em

alginate (Silva et al., 2011; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). Experimentos prévios com camundongos, demonstraram que devido a sua baixa persistência, esta estirpe não foi capaz de induzir resposta imunológica protetora quando inoculada sem adjuvantes, mesmo sendo uma estirpe viva atenuada, embora quando avaliadas no hospedeiro natural, ambas conferiram proteção significativa (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b).

3.5 Adjuvantes vacinais

Avanços tecnológicos em diversas áreas de pesquisa relacionadas a produção de vacinas têm contribuído para a descoberta de novas formulações vacinais. Com o advento de técnicas de biologia molecular e de bioinformática, a identificação de novos antígenos imunogênicos tem aumentado, contribuindo para o surgimento de diferentes tipos de vacinas, permitindo utilizar antígenos de forma isoladas ou em associação, o que os torna viáveis como novos candidatos a vacinas (Paul et al., 2018; Sadeghi et al., 2019).

Estas vacinas apresentam como vantagens serem mais seguras que vacinas vivas atenuadas, tanto para o paciente a ser imunizado, bem como para todos os indivíduos envolvidos durante o processo de produção (Perkins et al., 2010). No entanto estas vacinas têm como desvantagens, sua baixa imunogenicidade, não conferindo desta forma uma resposta imune satisfatória e duradoura comprometendo o sucesso da vacinação, tornando-se necessário por vezes o uso de um maior número de doses e em intervalos de tempo menores (Abkar et al., 2015; Paul et al., 2018).

Com intuito de aumentar a resposta imune, contribuindo para a eficácia destas vacinas é necessário lançar mão de substâncias que incitem uma reação imune mais intensa e duradoura, estas substâncias são conhecidas como adjuvantes. Tais substâncias são utilizadas objetivando melhorar a resposta imune frente a novas preparações vacinais (Brunner et al., 2010). Uma vantagem no uso destes compostos é a possibilidade de reduzir consideravelmente a quantidade de antígenos utilizados, isto também é possível devido a utilização de adjuvantes como sistemas de entrega de antígenos, conduzindo a um aumento no intervalo e diminuição do número de imunizações (Meeren et al., 2018; Sadeghi et al., 2019).

Estas substâncias são classificadas com base em seus aspectos físico, químicos e biológicos. Os adjuvantes ideais devem possuir algumas características dentre as quais, serem produzidos de forma sintética, apresentando maior segurança, pureza, produzidos de forma sustentável e serem estáveis, atuarem de forma conjunta com antígenos, melhorando e garantindo uma resposta satisfatória, apresentarem padrões morfológicos que permitam

melhor captação por células do sistema imune, serem versáteis quanto ao seu uso por diferentes vias de imunização e conduzir a redução do número de imunizações necessárias (Reed et al., 2013).

Embora atualmente muitas vacinas que apresentem adjuvantes em sua formulação contra a infecção por *Brucella* não sejam vivas atenuadas (Golshani et al., 2018; Abkar et al., 2019; Shim et al., 2020), alguns trabalhos têm demonstrado que, associação de adjuvantes a estirpes atenuadas candidatas a vacina, melhora a resposta protetora, e indução de resposta imune tanto do tipo celular quanto humoral (Silva et al., 2015b; Carvalho et al., 2020; Eckstein et al., 2020; Costa et al., 2020). Esses dados demonstram uma capacidade promissora na utilização deste tipo de preparações vacinais, demonstrando a necessidade de se expandir estudos que possam avaliar novas substâncias adjuvantes, com a perspectiva de se obter respostas satisfatórias que possam conferir imunidade duradoura e eficaz.

Dentre os adjuvantes mais utilizados em experimentação animal estão os preparados a partir de sais de alumínio e os adjuvantes completo e incompleto de Freund's. Os sais de alumínio em especial o hidróxido de alumínio, um metal amplamente distribuído por todo o mundo é bastante utilizado no preparo tanto em vacinas destinadas a animais quanto humanos (Bégué et al., 2012; Burakova et al., 2018). As formulações contendo este adjuvante são capazes de induzir a uma resposta imune com níveis consideráveis de IgG, em especial a subclasse IgG1, além de níveis elevados de IFN- γ e IL-4 (Barouch et al., 2018; Chisholm et al., 2019). Embora bastante utilizada, as formulações contendo estes compostos apresentam algumas desvantagens frente a seu uso, como por exemplo: indução de forte reação inflamatória no local da aplicação (Asín et al., 2019; Gherardi et al., 2019), bem como sua capacidade de se acumular em tecidos como sistema nervoso central (Miguel et al., 2020), e ósseo, além de seus efeitos serem agravados principalmente em pacientes com doença renal crônica devido ao fato de sua eliminação ocorrer através da urina (Goullé e Grangeot-Keros, 2020.)

Outro adjuvante muito empregado no preparo de vacinas avaliadas em pesquisa são os adjuvantes completo e incompleto de Freund's. Este composto é formado a partir de solução emulsões de óleo em água, onde no primeiro há ainda a presença de *Mycobacterium tuberculosis* mortas pelo calor (Claassen et al., 1992). Este adjuvante por apresentar uma forte indução da resposta imune, pela sua capacidade de ativação de células apresentadoras de antígenos, induzindo ainda a uma resposta tanto do tipo humoral e celular, com níveis elevados de IgG e aumento no número de linfócitos TCD4 e TCD8 (Torréns et al., 2005; Mousavi et al., 2019). Apesar de ser amplamente utilizado experimentalmente, possui

efeitos adversos que limitam sua utilização comercial (Powers et al., 2007). Estes efeitos podem ser variáveis de acordo com a dose utilizada, espécie a ser imunizada e via de administração, e podem conduzir a uma resposta inflamatória no local da inoculação de curso que pode variar de agudo a crônico e em alguns casos levar a complicações sistêmicas (Claassen et al., 1992; Halliday et al., 2004; Windsor et al., 2005). Devido a estas características este adjuvante não é apropriado para utilização em humanos, e mesmo em experimentação animal, pesquisadores buscam formas alternativas a seu uso visando o bem-estar animal (Stills Jr, 2005; Powers et al., 2007).

Um destes adjuvantes é o alginato, um biopolímero extraído de algas e que apresenta diversas aplicações desde sua utilização na indústria alimentícia como agentes estabilizantes, emulsificantes e texturizantes (Torres et al., 2019; Zhang et al., 2020), na indústria farmacêutica utilizado na composição de produtos cicatrizantes (O'Meara et al., 2015), aglutinante (Wright et al., 2014; Szekalska et al., 2016) e para o microencapsulamento de células (Gamboa et al., 2009; Silva et al., 2015b; Costa et al., 2020). Desta forma, esta substância tem sido utilizada para encapsular antígenos e otimizar a resposta imune induzida por vacinas, sendo utilizado em preparações vacinais com antígeno vivo atenuado (Silva et al., 2015b; Costa et al., 2020). Sua aplicação tanto de forma injetável como em forma de aerossóis tem sido avaliada em modelos experimentais como camundongos, ovinos e primatas não humanos (Arenas-Gamboa et al., 2009; Silva et al., 2015b; Costa et al., 2020; Kesarwani et al., 2021). Este adjuvante é capaz de incitar uma resposta imune mais eficaz contra a infecção intracelular por alguns agentes, induzindo a produção de citocinas tais como, IFN- γ e TNF, além de não induzir a processos alérgicos que poderiam comprometer seu uso como adjuvante (Kesarwani et al., 2021).

Outro composto adjuvante que vem sendo frequentemente utilizado em experimento na produção de vacinas em animais é a quitosana. Este polissacarídeo originário a partir da acetilação da quitina encontrada em crustáceos e na parede celular de fungos, assim como o alginato é utilizado para diversos fins. Por ser um composto biodegradável, biocompatível, não tóxico e principalmente por apresentar capacidade imunomoduladora, esta substância vem sendo cada vez mais utilizada em preparações vacinais, onde tem demonstrado resultados que encorajam ainda mais seu uso. Devido sua característica mucoadesiva este composto é frequentemente empregado em vacinas aplicadas via mucosa (Abkar et al., 2017; Dumkliang et al., 2021), embora apresente grande versatilidade quanto a via de aplicação, uma característica interessante para soluções adjuvantes (Abkar et al., 2015; Abkar et al., 2019; Shim et al., 2020). Este adjuvante é capaz de induzir uma melhor

captação de antígenos, contribuindo para aumento da eficácia da resposta imune, que de acordo com alguns estudos variam de acordo com a via de aplicação, levando a produção de níveis consideráveis de IgG, além de estimular a secreção de interleucinas em especial IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-6, IL-17 e IgA (Abkar et al., 2015; abkar et al., 2019; Shim et al., 2020).

3.6. Uso de adjuvantes em vacinas contra brucelose.

Adjuvantes são usualmente utilizados em preparações de vacinas de subunidades ou inativadas com o intuito de melhorar sua capacidade antigênica, economia de antígenos e maior segurança das vacinas (Abkar et al., 2017; Golshani et al., 2018; Kumar et al., 2019), contudo, sua utilização tem sido cada vez mais frequente em vacinas vivas atenuadas (Zriba et al., 2019; Costa et al., 2020; Eckstein, et al., 2020; Castaño-Zubieta et al., 2021).

O uso biopolímeros como adjuvantes em preparações vacinais, tais como o alginato, podem funcionar como um sistema de entrega de antígenos, tendo desta forma a capacidade de conduzir a uma liberação mais lenta, promovendo uma resposta imune mais duradoura e organizada (Brunner et al., 2010; Rice-Ficht et al., 2010). Este adjuvante tem sido frequentemente utilizado no preparo de vacinas contra brucelose, com intuito de otimizar sua eficiência, conduzindo a resultados satisfatórios, sinalizado seu uso promissor no desenvolvimento de vacinas (Arenas-Gamboa et al., 2009; Silva et al., 2015; Costa et al., 2020; Eckstein, et al., 2020; Castaño-Zubieta et al., 2021).

Outros grupos de adjuvantes vacinais, também vêm sendo utilizados no preparo de vacinas contra brucelose, dentre estão alguns copolímeros como polioxidônio e quitosana (Denisov et al., 2010; Abkar et al., 2019; Shim et al., 2020). O polioxidônio combinado a uma estirpe viva atenuada de *B. abortus* por via subcutânea foi capaz de conferir em cobaio, resposta imune humoral com altos níveis de IgG por tempo prolongado (Denisov et al., 2010).

Estudos demonstram que nanopartículas de quitosana a diferentes antígenos tem a capacidade de induzir resposta imune tanto do tipo humoral quanto celular (Abkar et al., 2019; Shim et al., 2020). Em um trabalho realizado por Shim et al. (2020), utilizando nanopartículas de quitosana associada a proteínas recombinantes de *B. abortus* por meio de imunização intranasal em camundongos, observaram uma indução de níveis consideráveis de IgG, com predomínio da subclasse IgG1, além de citocinas inflamatórias importantes na resposta imune contra patógenos intracelulares como IFN- γ . Embora este adjuvante já tenha sido empregado em preparações vacinais contra *Brucella*, seu uso em vacinas vivas

atenuadas ainda não foi verificado, demonstrando a importância em se avaliar a capacidade indutora de resposta imune e protetora em vacinas com essa característica.

Os adjuvantes podem ser ainda combinados entre si para melhorar o tipo de resposta almejada, conduzindo a melhora da imunogenicidade dos antígenos. Esta combinação de diferentes adjuvantes pode gerar respostas mais eficientes, induzindo a produção de substâncias envolvidas em diferentes tipos de resposta imune ampliando sua capacidade protetora (Denisov et al., 2010; Golshani et al., 2018).

Com base nestes aspectos, é necessário buscar novas substâncias adjuvantes que possam ser utilizadas em formulações vacinais, tanto para uso animal quanto humano, que possuam características como versatilidade e praticidade de seu uso, baixo custo de produção, serem estáveis e biocompatíveis, e principalmente, que possam contribuir para uma resposta imune eficaz e duradoura. Além da associação de adjuvantes já conhecidos, buscar novas formulações é essencial, como forma de se conseguir adjuvantes que atendam as premissas necessárias para sua utilização, como é o caso da matriz polimérica (MP), um copolímero dibloco de polipropilenoglicol-co-poli(etilenoglicol) desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Juiz de Fora, MG. Este copolímero apresenta-se em fase sólida a temperatura 37 °C e em fase líquida a 4 °C. Acredita-se que suas características físico-químicas podem favorecer sua utilização como um adjuvante vacinal que se polimeriza ao ser inoculado no animal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Declarações de ética.

Os procedimentos experimentais com camundongos seguiram as leis e regulamentos, sendo os procedimentos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo CEUA/UFMG n° 28/2020.

4.2 Estirpes bacterianas e condições de cultivo.

Neste estudo foram utilizadas as estirpes bacterianas *B. ovis* do tipo selvagem ATCC 25840 e *B. ovis* $\Delta abcBA$, uma estirpe mutante gerada a partir da deleção de *open read frame* (orf) *abcA* e orf *abcB* do locus *abcEDCBA* localizado no cromossomo II de *B. ovis* que codificam um sistema transportador do tipo ABC (Silva et al., 2011); e a cepa *B.*

ovis $\Delta abcBA$ *mCherry* (Silva et al., 2014). Esta última apresenta a capacidade de fluorescência por expressar a proteína *mCherry*, desenvolvida a partir da inserção de um plasmídeo pKSoriT-*bla-kan-PsojA-mCherry* adjacente a proteína promotora translocase SecE de acordo com o descrito por Copin et al., (2012).

Estas estirpes foram cultivadas em ágar triptona de soja (TSA, Invitrogen, EUA) contendo 1% de hemoglobina (Becton-Dickinson, EUA) durante três dias, a uma temperatura constante de 37 °C em estufa umidificada e com atmosfera a 5% de CO₂, tem sido acrescentado às placas das estirpes mutantes 100µg/mL de canamicina (Gibco, Brasil).

Posteriormente estas bactérias foram ressuspensas em solução estéril de tampão fosfato-salino (PBS/pH 7.4, Gibco, ThermoFisher Scientific, EUA). Em seguida, foi estimada a concentração bacteriana na suspensão mensurando a densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) em um espectrofotômetro (Bio-Rad, Hercules, CA). Foi considerando que na OD₆₀₀ de 0,25 a concentração estimada de bactéria seja de aproximadamente 3x10⁹ e 1x10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) /mL para as estirpes selvagem e mutante respectivamente. Com base nestes dados, realizou-se preparo dos inóculos na concentração de trabalho desejada. Para a confirmação da concentração dos inóculos, realizou-se diluição seriada e o plaqueamento em meios de cultivo contendo TSA com 1% de hemoglobina acrescentado de 100µg/mL de canamicina para as estirpes mutantes.

Todos estes procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar no Laboratório Patologia Molecular de nível 2 de biossegurança, na Escola de Veterinária da UFMG.

4.3. Avaliação da estabilidade da matriz polimérica.

O comportamento e estabilidade da matriz polimérica em diferentes condições ambientais que possam mimetizar uma situação real de sua utilização em preparações vacinais foram avaliados. Uma mistura contendo a matriz polimérica associada a suspensão bacteriana de *B. ovis* $\Delta abcBA$ na concentração de 10¹⁰ UFC/mL foi avaliada quanto: tempo necessário para polimerização (solidificação) à temperatura de 37 °C (em estufa umidificada com 5% CO₂) ou de 21 °C (em temperatura ambiente sob a bancada); condição adequada de refrigeração para manutenção em fase líquida (ideal para inoculação) mantendo a mistura em gelo em escamas (0 °C) ou em gelo químico (4 °C). Tais análises foram realizadas em triplicatas com 2mL da solução da matriz polimérica em duas concentrações diferentes (185µg/mL e 190µg/mL) associadas ou não a bactéria.

4.4. Preparo da vacina com matriz polimérica.

O primeiro adjuvante avaliado neste estudo foi uma MP. Suspensão bacteriana de contendo 1×10^{10} UFC/mL de *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi preparada em PBS para definição da concentração em OD₆₀₀, com posterior centrifugação, desprezando-se o sobrenadante e ressuspendendo as bactérias diretamente na MP na concentração de 185µg/mL, permanecendo sob refrigeração até o momento da inoculação.

4.5. Preparo das vacinas com alginato e quitosana.

O encapsulamento da estirpe vacinal com alginato (Sigma-Aldrich, EUA) e quitosana (Sigma-Aldrich, EUA), foi feito com uma suspensão bacteriana contendo concentração de 1×10^9 UFC/mL de *B. ovis* $\Delta abcBA$ de acordo com a metodologia anteriormente descrita por Silva et al., (2015) e Rocha et al., (2021). A suspensão bacteriana foi preparada em PBS, centrifugada com o sobrenadante desprezado e ressuspendida em solução de alginato a 1%. Utilizando uma seringa de insulina (1 mL) acopladas a agulha 33G, esta solução foi gotejada em de solução polimerizante (CaCl 0,5 mM) permanecendo por 15 minutos em homogeneização. Após a formação das cápsulas, estas foram lavadas duas vezes, sob homogeneização durante 5 minutos, com solução MOPS (10 mM, Sigma-Aldrich, EUA) com 0,85% de NaCl em pH 7.4. Após as lavagens, as cápsulas de alginato foram imersas em solução composta por quitosana contendo ácido acético a 1% e acetato de sódio em pH 5,0, por 30 minutos sob homogeneização. Para o preparo das cápsulas de alginato e quitosana vazias (sem bactérias), o procedimento seguiu os mesmos princípios, sem a incorporação de bactérias a solução de alginato.

4.6. Imunização dos camundongos.

Neste experimento foram utilizados 30 camundongos, fêmeas C57BL/6, de 6 a 7 semanas de idade que foram distribuídas em 5 grupos (n=6) sendo estes: alginato + quitosana + 1×10^9 UFC/mL de *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$); alginato + quitosana (AQ); MP + 1×10^{10} UFC/mL *B. ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$); MP e o grupo controle inoculado com PBS (não vacinado). Os camundongos foram inoculados por via subcutânea com 100µL das preparações vacinais ou PBS estéril em uma única dose. Nos animais imunizados com preparações contendo AQ a dose vacinal foi dividida em dois locais de aplicação (região cervical dorsal e região pélvica), na tabela 1 estão resumidas as informações referentes a dose, concentração e vias de inoculação dos adjuvantes utilizados. A partir da imunização, os camundongos foram observados diariamente até o 42º dia pós

vacinação para monitorar o local da inoculação, mensurando a espessura da pele com auxílio de um paquímetro, e observar alteração de comportamento relacionados a dor local e a formação de fístulas.

Tabela 1. Diferentes adjuvantes associados a *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ utilizados para imunização dos animais.

Adjuvante	Concentração	Volume	Via de inoculação/local
Matriz polimérica	1×10^{10} UFC/mL	100 μ L	Subcutânea (Região cervical)
Alginato com quitosana	1×10^9 UFC/mL	*100 μ L (50 μ L/50 μ L)	Subcutânea (Região cervical e pélvica)

* O volume total foi dividido em dois locais de inoculação devido.

4.7. Ensaio de proteção.

Transcorridas 4 semanas após a vacinação, todos os grupos foram submetidos ao desafio infeccioso com dose de 1×10^6 UFC/animal da estirpe do tipo selvagem *B. ovis* ATCC 25840. Duas semanas após o desafio, os camundongos foram eutanasiados utilizando-se sobre dose anestésica composta por cloridrato de xilazina (2%, 30mg/Kg, Syntec, Brasil) e cloridrato de cetamina (1%, 210mg/Kg, Syntec, Brasil), misturadas e injetadas por via intraperitoneal em um volume de 100 μ L. Durante a necropsia foi coletado sangue dos animais, por punção cardíaca, fragmentos de baço e fígado, pele do local de inoculação e linfonodo cervical. Fígado e baço foram coletados para avaliar a recuperação bacteriana e determinar o índice de proteção de cada vacina.

A determinação da proteção conferida pelas vacinas foi avaliada através da redução na recuperação de UFC em camundongos vacinados em comparação aos camundongos não vacinados, calculando-se assim o índice de proteção (diferença de UFC no baço de animais não imunizados dos animais imunizados).

4.8. Isolamento bacteriano.

Para determinar a recuperação bacteriana de *B. ovis* nos órgãos alvo (baço e fígado) de camundongos infectados com *B. ovis*, fragmentos destes órgãos foram coletados de maneira asséptica em tubos falcon de 15 mL contendo 2 mL de PBS estéril, pesados e macerados com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Ultra Stirrer, Biotech, EUA). Com o intuito de evitar a contaminação de amostras durante a maceração o homogeneizador foi lavado entre as amostras em uma bateria de água destilada estéril, seguida de álcool 70% e mais duas vezes em água destilada estéril. Deste conteúdo obtido das macerações, foi realizada uma diluição seriada e plaqueadas em TSA com 1% de hemoglobina. Placas de TSA com ou acrescimento de 100µg/mL de canamicina foram destinadas a recuperação da estirpe vacinal. As placas semeadas foram mantidas em estufa com umidade controlada a uma temperatura de 37 °C e atmosfera constante 5% CO₂ e colônias contadas após 3 a 5 dias.

4.9. Avaliação histopatológica.

Fragmentos de tecidos do sítio de inoculação da vacina, linfonodo cervical superficial, fígado e baço foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10% durante 24 horas. Em seguida fragmentos de tecidos foram desidratados com álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%) com posterior diafinização em xilol. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em parafina para confecção dos blocos seccionados em micrótomo (3 µm de espessura) aderidos a lâminas de vidro e corados pela hematoxilina e eosina. Avaliação histopatológica foi realizada e para as lesões de inflamação e necrose observadas no baço e fígado, foi atribuído um escore, classificado de acordo com a intensidade das lesões inflamatórias sendo: 0 (zero) ausência de lesão, 1 (um) lesão discreta, 2 (dois) lesão moderada e 3 (três) lesão intensa e quanto a ausência de necrose 0 (zero) ou a presença de necrose 1 (um), perfazendo um valor total máximo obtido de 4 (quatro). As lesões nos sítios de inoculação seguiram o mesmo princípio de escore observando-se ainda o tipo de infiltrado inflamatório presente. As lâminas foram avaliadas de forma cega por dois patologistas veterinários.

4.10. Microscopia de fluorescência.

Para visualização da estirpe bacteriana *B. ovis* $\Delta abcBA$ associada aos adjuvantes utilizados neste estudo, realizou-se o preparo de vacinas com a estirpe bacteriana *B. ovis* $\Delta abcBA$ *mCherry*, que expressa uma fluorescência vermelha, nas mesmas condições e

concentração descritas para a confecção das vacinas utilizadas na imunização dos camundongos. As suspensões vacinais foram observadas e imagens capturadas em fotomicroscópio Leica, DM 4000 B (Leica Microsystems, Alemanha).

4.11. Avaliação da resposta imune humoral.

A resposta imunológica humoral induzida em camundongos após a vacinação foi avaliada por meio de ELISAI, mensurando títulos específicos de IgM, IgG total e suas subclasses, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Para isso foram utilizadas placas de ELISA (Costar, Sigma-Aldrich, EUA) previamente sensibilizados com 100µL de antígeno bruto sonificado de *B. ovis* na concentração de 0,25 µg por poço por 18 horas a 4°C. Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas duas vezes com PBST 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) e bloqueadas com 200 µL de PBS acrescido de 5% de albumina sérica bovina (BSA) durante 1 hora a 37 °C. Após o bloqueio, a solução dos poços foi removida e adicionado amostras de soros dos animais que foram diluídas (1:100) em solução de PBS com 2,5% de BSA, adicionadas aos poços e incubadas por 1 hora em estufa a 37°C.

A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBST 0,05% e 100 µL do anticorpo secundário anti-camundongo (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído 1:2.000 em PBS-BSA 2,5% foram adicionados aos poços. Após a incubação a 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por três vezes com a solução de lavagem, e então foi adicionado 100 µL/poço do substrato (0,1 M ácido cítrico anidro, 0,2 M fosfato de sódio, 0,05% OPD e 0,1%. H₂O₂). As placas foram protegidas da luminosidade por 5 minutos com a solução reveladora, sendo a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi analisada em leitor de ELISA a 492 nm (MR-96A Microplate reader, Mindray, China). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.12 Análise estatística.

A análise estatística dos dados obtidos na contagem de UFC e na mensuração de anticorpos, foram normalizados por transformação logarítmica, e submetidos a análise de variância (ANOVA). Em seguida suas médias comparadas através do teste de Tukey. Para avaliação do escore das lesões nos tecidos avaliados foram analisados por meio do teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis. Todas estas análises foram realizadas com auxílio do

software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Prism software 8.0.1, Inc, EUA). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 A matriz polimérica apresentou viabilidade de seu uso como adjuvante em condições ambientais.

Considerando a característica única da MP de ser líquida a baixas temperaturas e sólidas (polimerizadas) a temperatura corporal, verificamos em análises *in vitro* em condições ambientais que são usuais para preparações vacinais. Foram testadas duas concentrações da matriz polimérica associada a estirpe vacinal. A formulação vacinal na concentração de $185 \mu\text{g/mL}$ iniciou a polimerização em temperatura corporal (estufa a 37°C) e em temperatura ambiente (sob bancada a 21°C) em um tempo médio de 1:33 e 2:29 minutos, respectivamente. A polimerização completa ocorreu em 6:22 e 11:33 minutos, respectivamente. Quando comparada com a formulação vacinal na concentração de $190 \mu\text{g/mL}$, não houve diferença significativa nos tempos iniciais e finais de polimerização, quando comparada a concentração de $185 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Estes tempos foram considerados adequados para preparação, suspensão e inoculação de uma vacina a campo.

Outro aspecto avaliado foi se a formulação vacinal permanece na fase líquida em meios de conservação sob refrigeração como gelo em escamas ou gelo químico. A MP polimerizada (após retirada da estufa a 37°C) em ambas concentrações se liquefez em menos de 1 minuto e se manteve na forma líquida constante (por até 3 horas avaliadas) a temperatura de 0°C (gelo em escamas). No entanto, quando armazenado a 4°C (gelo químico) com o frasco em contato com a superfície do gelo, este liquefaz apenas parcialmente (Tabela 3). Esses resultados mostram que o armazenamento apenas em contato com o gelo químico não é suficiente para manter a matriz polimérica líquida para tempo hábil de uso. Devido ao fato da matriz polimérica na concentração de $185 \mu\text{g/mL}$ apresentar estabilidade em fase líquida em gelo em escamas e maior tempo para polimerização em temperatura ambiente, permitindo tempo suficiente para o preparo e inoculação da vacina esta concentração foi escolhida para experimento de imunização dos camundongos. Estes resultados sugerem que a matriz polimérica, apresenta características permissíveis para sua utilização durante o preparo de vacinas podendo ser um bom candidato a adjuvante vacinal.

Tabela 2. Tempo (minutos) de polimerização da matriz polimérica associada a *B. ovis* $\Delta abcBA$ em diferentes concentrações e temperaturas.

Concentração X Temperatura	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Média \pm desvio padrão	
	IP	PC	IP	PC	IP	PC	IP	PC
185 μ g/mL 37 °C	1:32	6:06	1:20	6:44	1:49	6:18	1:33 \pm 0,010	6:22 \pm 0,013
190 μ g/mL 37 °C	1:18	5:07	1:07	5:35	1:27	5:44	1:17 \pm 0,007	5:28 \pm 0,013
185 μ g/mL 21 °C	2:30	12:07	2:24	12:12	2:35	10:21	2:29 \pm 0,004	11:33 \pm 0,043
190 μ g/mL 21 °C	2:30	10:54	2:24	10:25	2:11	8:52	2:21 \pm 0,006	10:03 \pm 0,044

IP: Polimerização inicial; PC: Polimerização completa; 37 °C: estufa; 21 °C: bancada

Tabela 3. Tempo necessário (minutos) para liquefação da matriz polimérica associada a *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ em diferentes concentrações e temperaturas.

Concentração X Temperatura	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média \pm desvio padrão
185 μ g/mL - 0 °C	0:29 LC	0:33 LC	0:28 LC	0:30 \pm 0,002 LC
190 μ g/mL - 0 °C	0:29 LC	0:33 LC	0:28 LC	0:30 \pm 0,002 LC
185 μ g/mL - 4 °C	0:56 LI	0:46 LI	0:45 LI	0:49 \pm 0,004 LI
190 μ g/mL - 4 °C	0:43 LI	0:21 LI	0:31 LI	0:31 \pm 0,007 LI

LC: Liquefação completa; LI: Liquefação incompleta; 0 °C: imerso em gelo em escamas; 4 °C: em contato com gelo químico

5.2 Aspecto microscópico das formulações vacinais.

O aspecto microscópico das formulações vacinais foi avaliado por meio de microscopia de fluorescência utilizando a estirpe *B. ovis* $\Delta abcBA$ *mCherry* associada aos adjuvantes. Ambos demonstram bactérias retidas em seu interior e amplamente distribuídas. As cápsulas de AQ apresentaram formatos ovóides irregulares, com tamanho variando entre 500 μm e 900 μm . A avaliação da MP revelou um material amorfo associado a bactérias difusamente distribuídas (Figura 1).

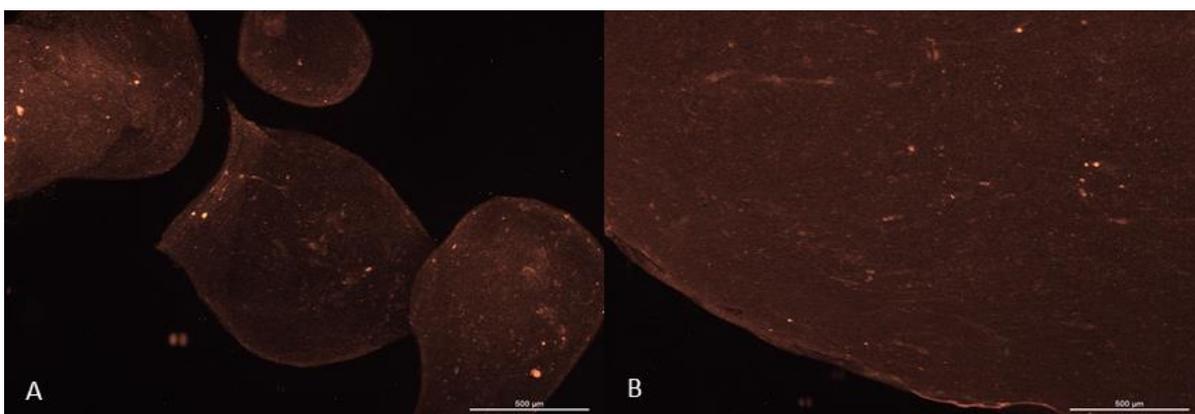


Figura 1. Imagem de microscopia de fluorescência demonstrando inúmeras bactérias vermelhas (*B. ovis* $\Delta abcBA$ expressando *mCherry*) associada a cápsulas de alginato com quitosana (A) ou a matriz polimérica (B).

5.3 A estirpe vacinal *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato com quitosana incitam uma resposta inflamatória intensa e duradoura no local da inoculação.

Devido ao fato de que em experimentos anteriores do nosso grupo demonstrarem que microcápsulas de AQ possa incitar uma resposta inflamatória intensa no local de inoculação (Rocha et al., 2021), este trabalho optou-se por aplicar a vacina em dois sítios subcutâneos distintos, na tentativa de minimizar reação local exacerbada.

Os animais imunizados com AQ+ $\Delta abcBA$ apresentaram desconforto durante a manipulação para pesagem diária. Animais imunizados com MP+ $\Delta abcBA$, não demonstravam qualquer desconforto. Acreditamos que este desconforto tenha contribuído para uma diminuição do ganho de peso dos animais no grupo AQ+ $\Delta abcBA$ aos 35 dias após vacinação (Figura 2).

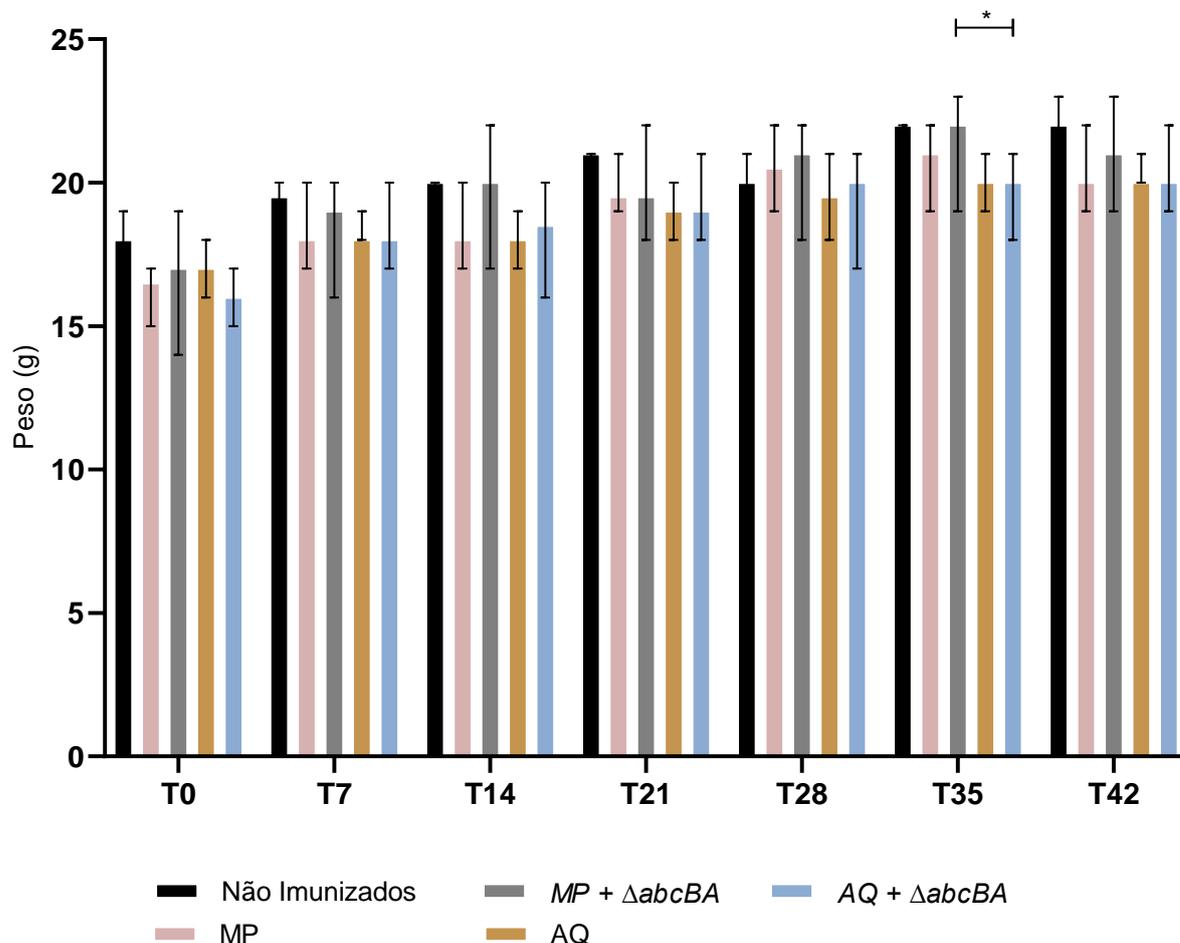


Figura 2. Peso de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) avaliado por 42 dias. Camundongos foram imunizados por via subcutânea com PBS (Não imunizados), matriz polimérica (MP), M P + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e *B. ovis* $\Delta abcBA$ + AQ (AQ+ $\Delta abcBA$). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05).

A inoculação da estirpe mutante encapsulada por alginato e quitosana, mesmo metade da dose por sítio, ocasionou nos camundongos imunizados, um aumento progressivo e duradouro nos locais da inoculação (Figura 3). Em três camundongos do grupo AQ+ $\Delta abcBA$ o local da inoculação apresentou formação de fístulas, drenando conteúdo de aspecto purulento, acompanhados de áreas ulceração (Figura 3F).

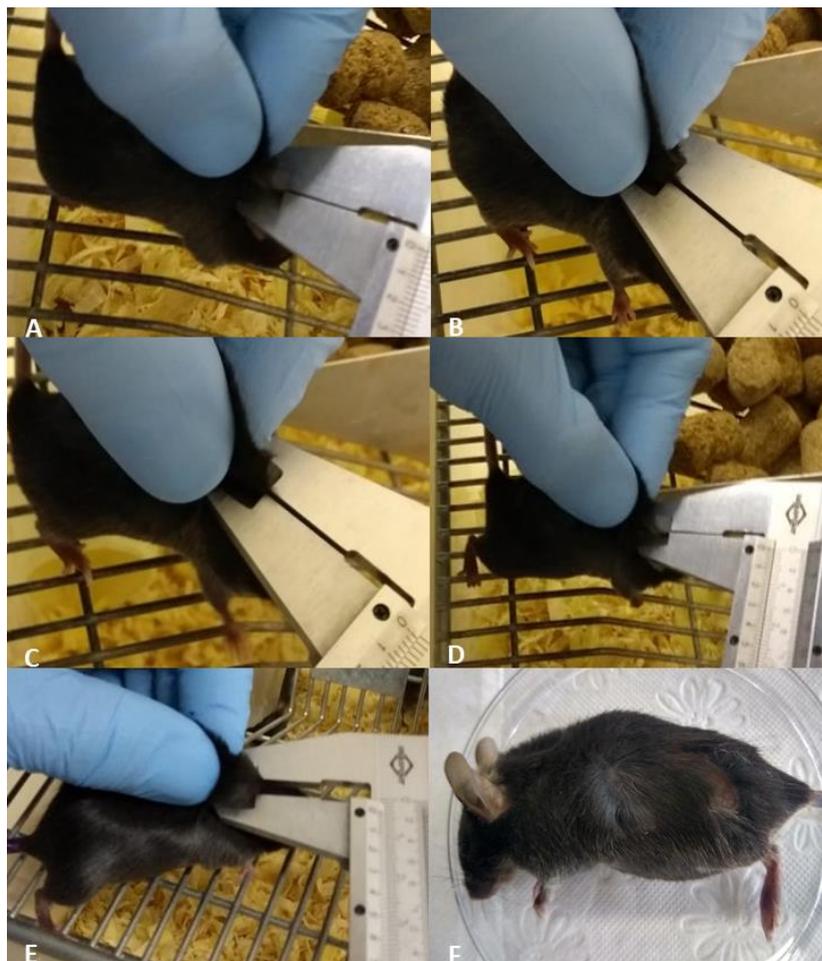


Figura 3. Avaliação da espessura da pele no local da inoculação, 14 dias pós imunização (A-E). Lesão cutânea avaliada no dia da eutanásia (42 dias pós-inoculação) (F). Camundongos foram imunizados por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e *B. ovis* $\Delta abcBA$ + AQ (AQ+ $\Delta abcBA$). Não imunizados (A); MP (B), AQ (C), MP+ $\Delta abcBA$ (D) nesses animais é possível observar o discreto aumento da espessura no local da imunização ao contrário do que foi observado no grupo AQ+ $\Delta abcBA$ (E F), onde os animais desenvolveram uma intensa reação local cutânea, com marcado aumento de volume (E), havendo em alguns casos (n=3), área focalmente extensa de ulceração cutânea na região pélvica condizente com o local da inoculação.

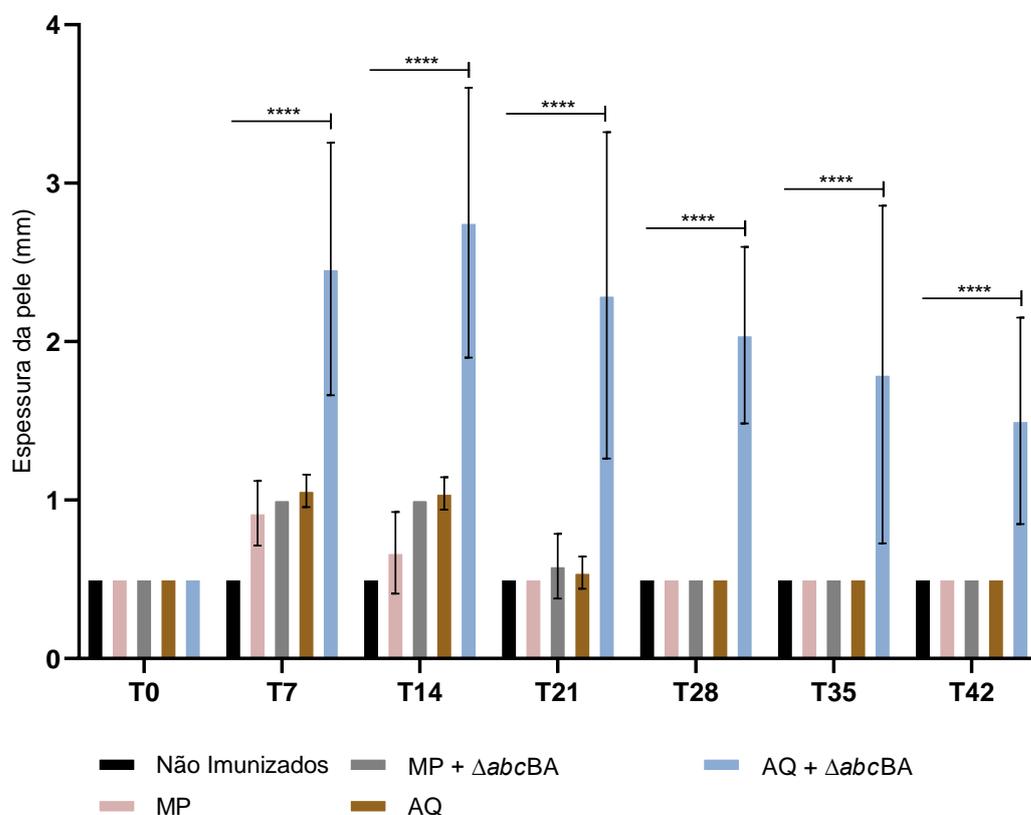


Figura 4. Espessura da pele no local da inoculação da vacina de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) avaliado por 42 dias. Camundongos foram imunizados por via subcutânea com PBS (Não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato e quitosana (AQ) e *B. ovis* $\Delta abcBA$ + AQ (AQ+ $\Delta abcBA$). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

Na avaliação histológica de fragmentos de pele colhidos do local da imunização, observou-se que no grupo AQ+ $\Delta abcBA$, as lesões eram caracterizadas por intenso infiltrado inflamatório que se estende desde a derme superficial à derme profunda, composto por macrófagos apresentando citoplasma de aspecto espumoso, neutrófilos em sua grande maioria degenerados, além de um moderado infiltrado linfoplasmocitário, apresentando ainda áreas multifocais de necrose moderada, acantose e marcada proliferação fibroblástica, além de áreas multifocais demonstrarem deposição moderada de conteúdo de aspecto

hialino (Figura 5). Estas alterações são compatíveis com uma intensa reação local, principalmente quando se faz uso da estirpe mutante no interior de cápsulas de alginato com quitosana. Pele dos animais do grupo AQ exibiram discreto infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário e neutrofílico multifocal, associado a discretas áreas com deposição de material de aspecto hialino associada a fibras colágenas, além de demonstrar raras áreas de necrose. Quando se avaliou a pele os animais do grupo MP+ $\Delta abcBA$, foi possível observar apenas um discreto infiltrado composto predominantemente por macrófagos, linfócito e raros neutrófilos. Pele dos animais do grupo MP e não imunizados observou-se somente raro infiltrado inflamatório multifocal composto por linfócitos e histiócitos.

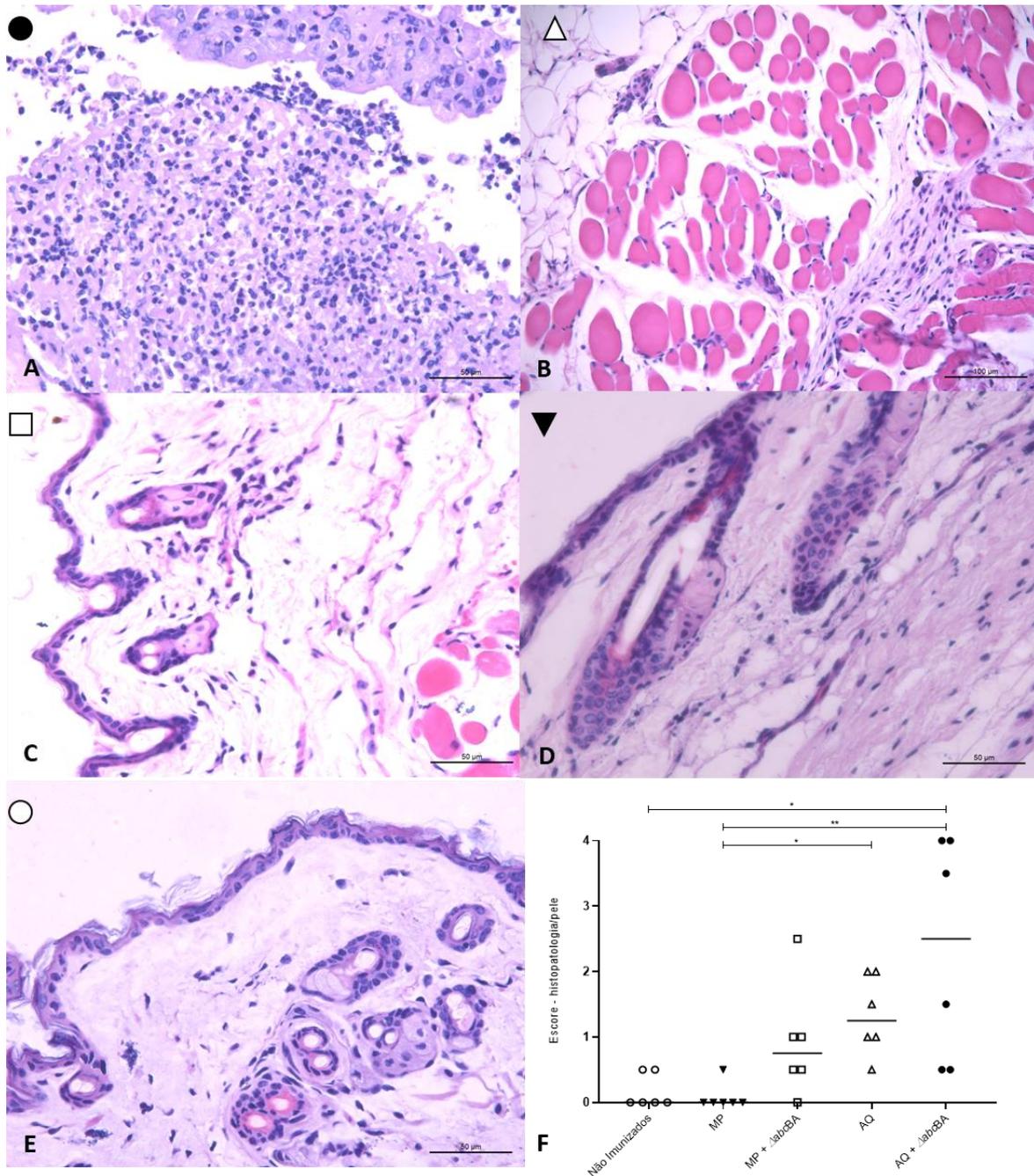


Figura 5. Apresentação da mediana do escore de lesões histopatológicas encontradas no sítio de inoculação da vacina de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizados por via subcutânea com *Brucella ovis* ΔabcBA encapsulada por alginato e quitosana (AQ+ΔabcBA) representadas por círculo preto (A), AQ por triângulo vazio (B), matriz polimérica (MP) + *B. ovis* ΔabcBA (MP+ΔabcBA) quadrado vazio (C), MP por triângulo preto invertido (D) e PBS (não imunizados) círculo vazio (E). Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e mediana (F). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-

Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.4 A vacinação com da estirpe *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato e quitosana conferiu proteção contra o desafio com estirpe selvagem de *B. ovis*.

O grupo imunizado com cápsulas de alginato com quitosana carregadas com a estirpe vacinal apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na recuperação bacteriana no baço (Figura 6) e fígado (Figura 7) após o desafio infeccioso quando comparados ao grupo não vacinado. Os demais grupos avaliados tiveram recuperação bacteriana semelhante ao grupo não vacinado nos dois órgãos avaliados.

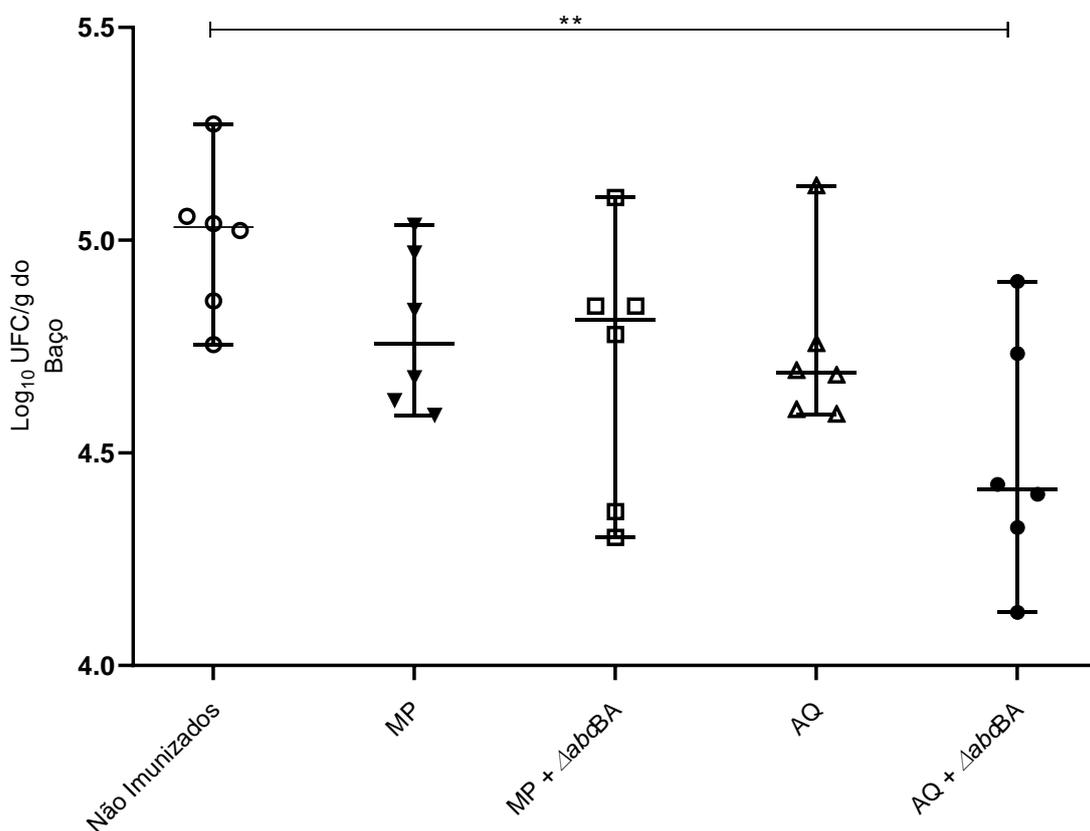


Figura 6. Recuperação bacteriana de baço de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizado), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os

resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

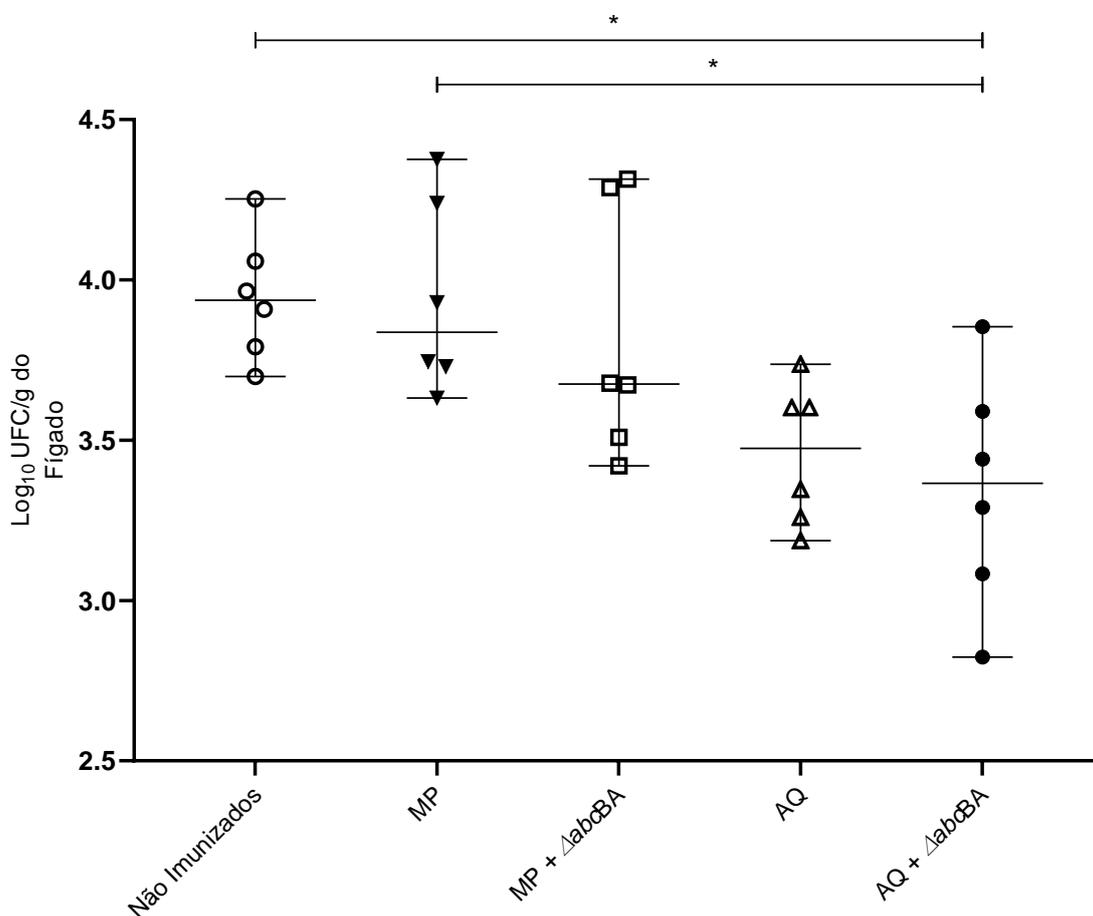


Figura 7. Recuperação bacteriana do fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizados por via subcutânea com PBS (não imunizado), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

Estes dados indicam que quando a estirpe vacinal está encapsulada por AQ há uma redução significativa de 0,514 Log e 0,598 Log de recuperação bacteriana no baço e fígado, respectivamente quando comparados ao não imunizado. Os demais grupos quando comparados aos animais não imunizados apresentaram índices de proteção semelhantes

entre si sendo como demonstrado na tabela 4. Com base nestes achados foi possível observar que o encapsulamento da estirpe vacinal com alginato e quitosana, induziu uma maior proteção frente ao desafio infeccioso.

Tabela 4. Proteção induzida em baço de camundongos C57BL/6 imunizados com *B. ovis* $\Delta abcBA$ e experimental mente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*.

Grupos	Via/Dose	Desafio	Log ₁₀ UFC/g de baço	Índice de proteção
MP	S.C./1x10 ⁸	I.P./1x10 ⁶	4,78	0,21
MP+ <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	S.C./1x10 ⁸	I.P./1x10 ⁶	4,70	0,29
AQ	S.C./1x10 ⁸	I.P./1x10 ⁶	4,74	0,25
AQ+ <i>B. ovis</i> $\Delta abcBA$	S.C./1x10 ⁸	I.P./1x10 ⁶	4,48	0,51

Matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$).

5.5 A imunização com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato e quitosana induz a uma forte resposta imune humoral em camundongos desafiados com estirpe selvagem de *B. ovis*.

Com a finalidade de avaliar a resposta imune humoral, níveis de anticorpos foram determinados em soro de camundongos imunizados e desafiados. O soro dos animais foi coletado durante a necropsia após punção cardíaca e a produção de imunoglobulinas IgM, IgG total e suas subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram avaliadas.

Ao avaliar os níveis de IgM entre os grupos observou-se comportamento semelhante dos níveis exibidos, não havendo diferença estatística significativa entre eles (Figura 8). Durante a avaliação dos níveis de IgG os animais do grupo AQ+ $\Delta abcBA$ exibiram altos níveis de IgG total quando comparado aos demais grupos, mostrando que esta formulação induz a uma forte resposta imune humoral com elevação deste isotipo. Outro grupo que exibiu aumento desta imunoglobulina, embora discreta foi o MP+ $\Delta abcBA$, principalmente quando comparado ao grupo não imunizado (Figura 9).

Após observar este aumento considerável nos níveis de IgG total do grupo AQ+ $\Delta abcBA$, foi avaliado qual das suas subclasses estavam envolvidas com esta elevação. Durante a avaliação constatou-se que este aumento estava principalmente relacionado a altos níveis das subclasses IgG1 e IgG2a, relacionadas a resposta linfócitos T auxiliares tipo Th2 e Th1 responsáveis respectivamente (Abkar et al., 2019; Nazifi et al., 2019). Durante a avaliação dos níveis destas subclasses não foi possível observar qual destas é mais predominante na vacina MP+ $\Delta abcBA$, que exibiu um ligeiro aumento nos níveis de IgG total comparada ao grupo dos animais não imunizados. Outra subclasse de IgG que exibiu aumento significativo no soro dos animais AQ+ $\Delta abcBA$, quando comparado aos demais grupos foi a IgG2b. Os níveis de IgG3 não exibiam elevação significativa em nenhum dos grupos avaliados.

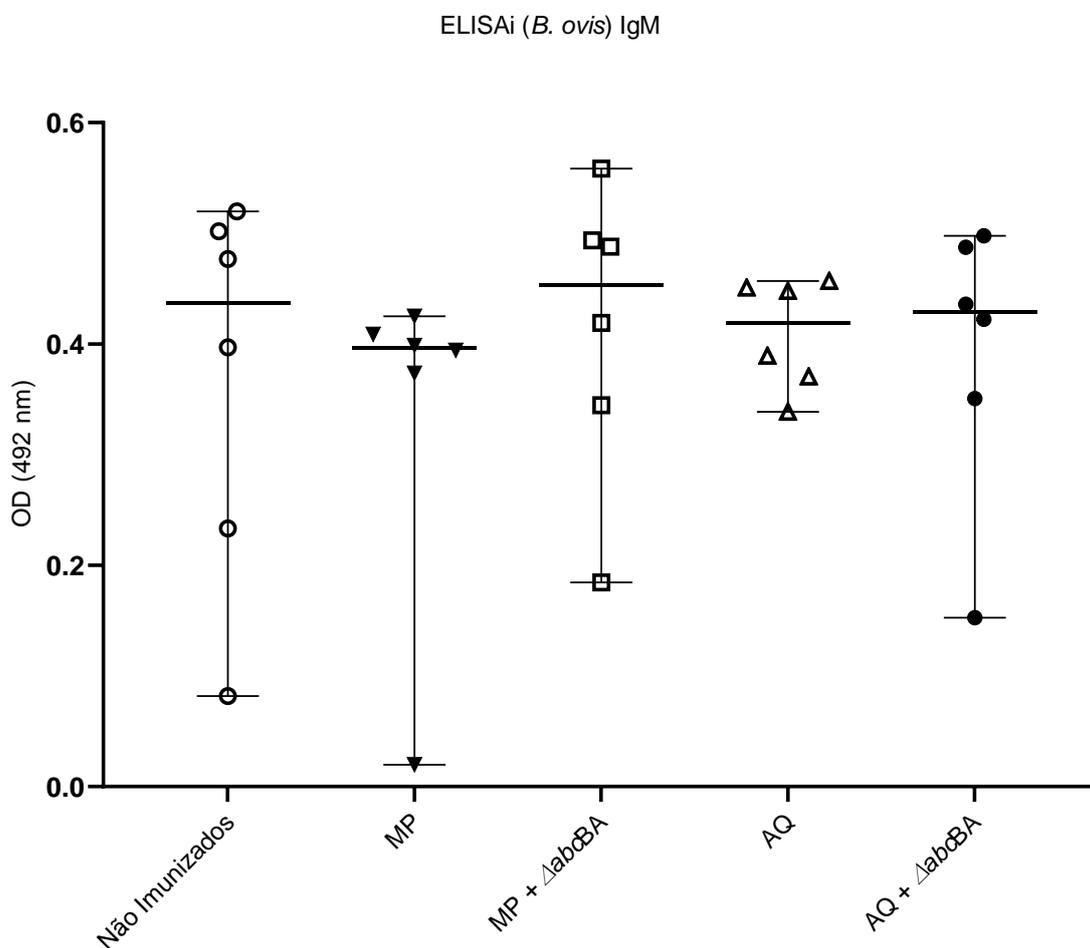


Figura 8. Determinação dos níveis totais de IgM por meio de ELISAI do soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados

com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

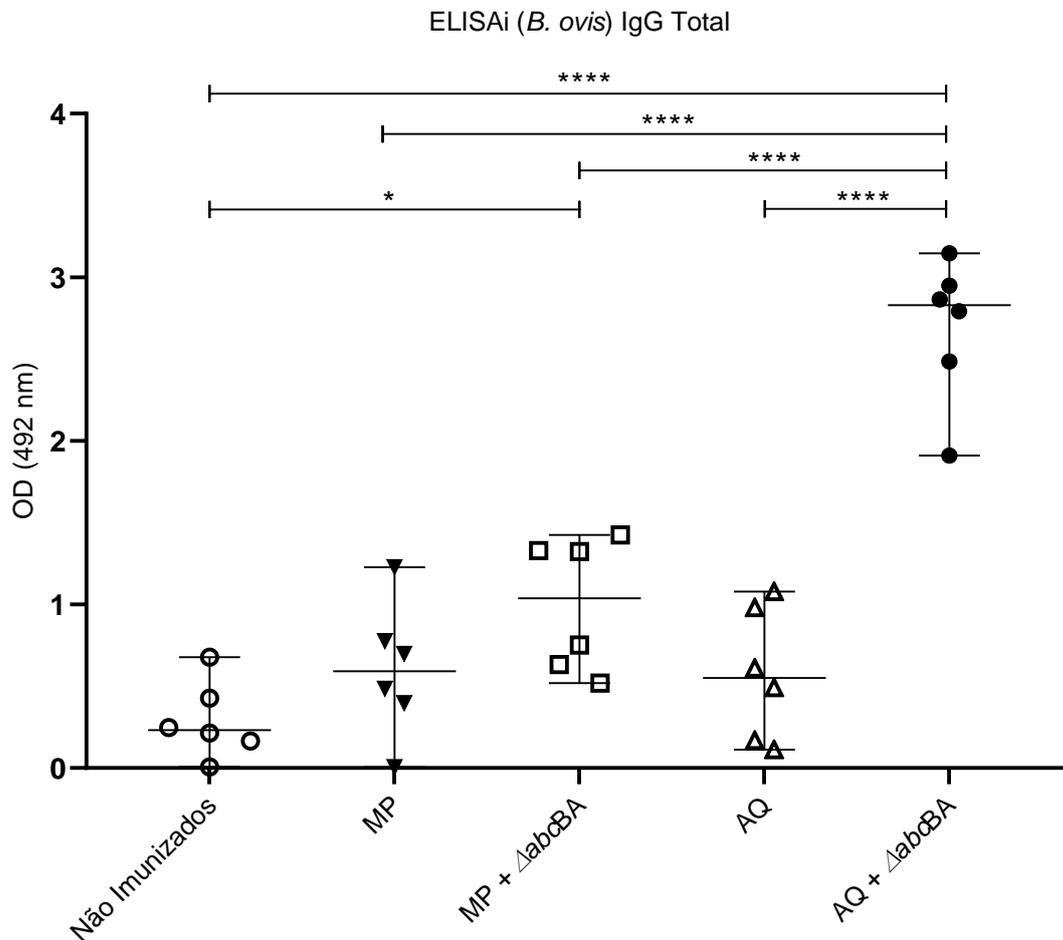


Figura 9. Determinação dos níveis totais de IgG por meio de ELISAI do soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

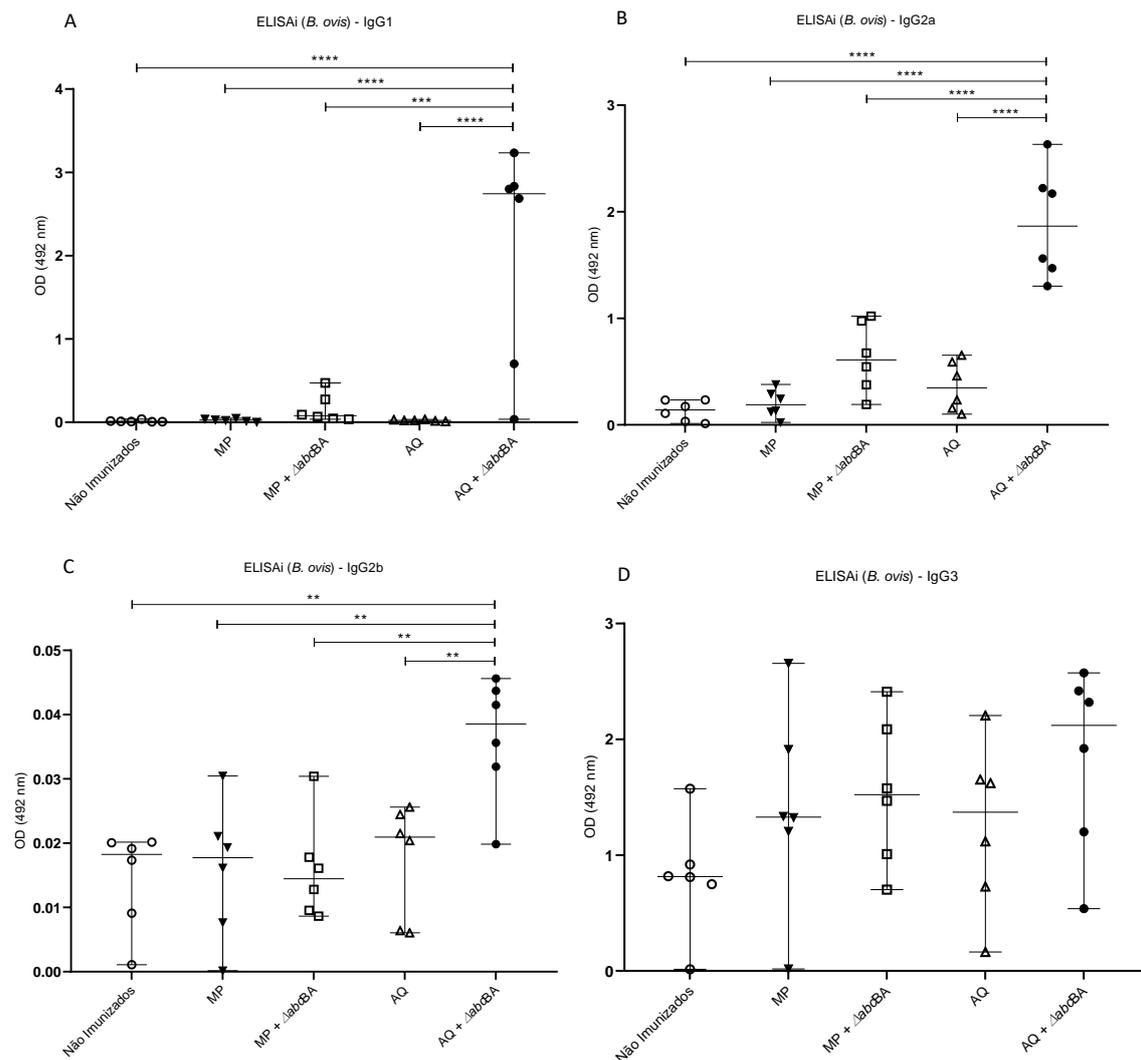


Figura 10. Determinação dos níveis de IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C) e IgG3 (D) por meio de ELISAI do soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6), imunizadas por via subcutânea com PBS (não imunizados), matriz polimérica (MP), MP + *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$), alginato com quitosana (AQ) e AQ + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (AQ+ $\Delta abcBA$) e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e média com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

5.6 A vacinação com estirpe mutante encapsulada por alginato e quitosana reduz as lesões inflamatórias no baço e fígado de camundongos infectados por estirpe selvagem de *Brucella ovis*.

Durante a necropsia, os animais de todos os grupos avaliados exibiram esplenomegalia e hepatomegalia, variando de discreta a moderada. Na microscopia, foi observado no baço dos camundongos não vacinados, áreas multifocais com infiltrado inflamatório neutrofílico intensos, associado a áreas multifocais de necrose (Figura 11E). Ao avaliar o fígado dos animais do grupo não imunizado, observou-se áreas multifocais de infiltrado inflamatório intenso composto por linfócitos, macrófagos e neutrófilos (microgranulomas), associado à presença de hepatócitos necróticos, de distribuição multifocal aleatória (Figura 12E).

Lesões semelhantes às observadas tanto no baço quanto no fígado dos animais não imunizados foram observadas também nos animais dos grupos MP, AQ e MP+ $\Delta abcBA$, (Figura 11e 12). No grupo AQ+ $\Delta abcBA$ observou redução da intensidade das lesões observadas tanto no baço quanto no fígado dos animais ($p < 0,05$) (Figura 11F e 12F).

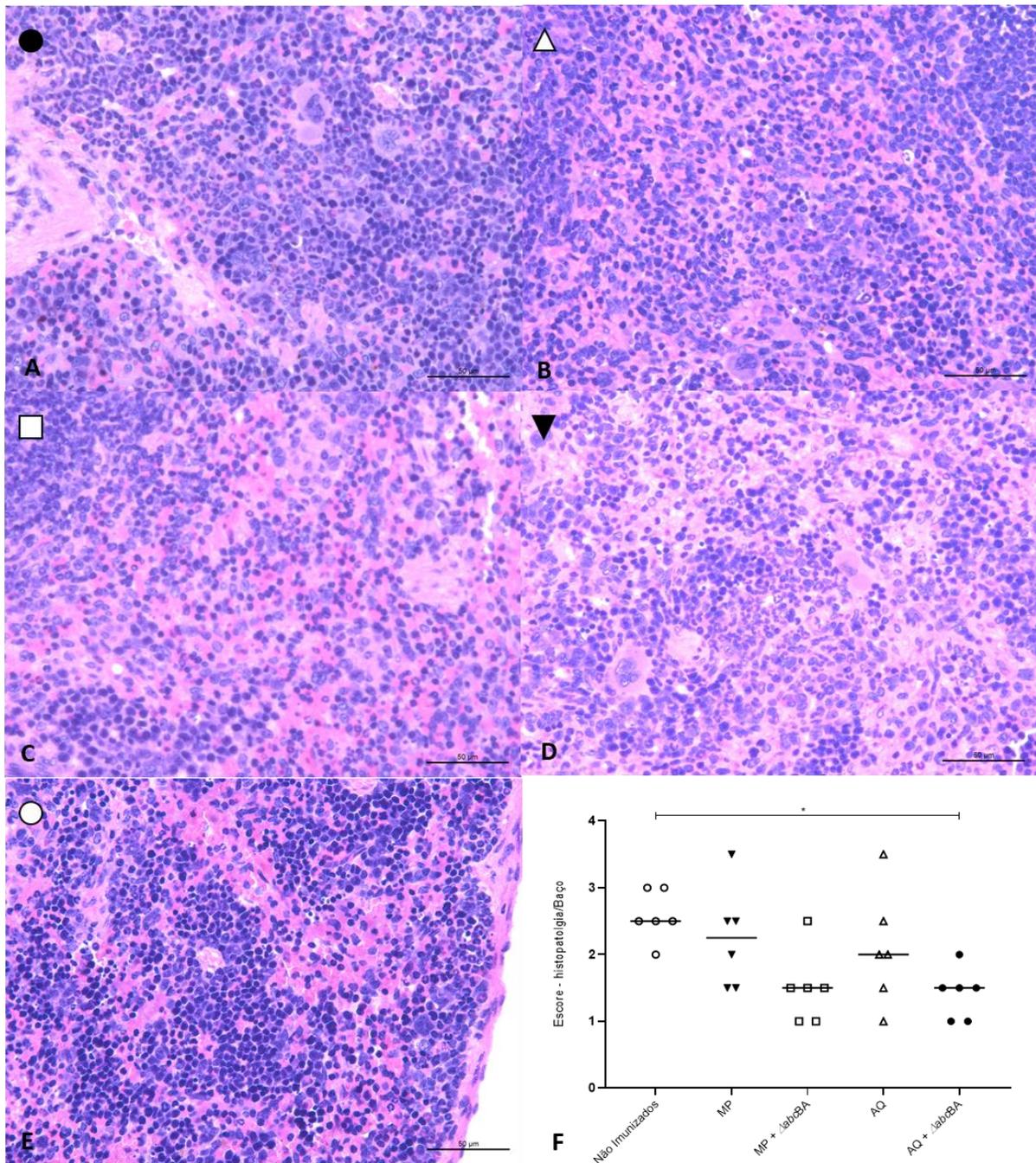


Figura 11. Avaliação histopatológica do baço de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) imunizadas por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada por alginato com quitosana (AQ+ $\Delta abcBA$) representada por círculo preto (A), AQ por triângulo vazio (B), matriz polimérica + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$) quadrado vazio (C), MP por triângulo invertido preto (D) e PBS (não imunizado) círculo vazio (E). Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e a mediana (F). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

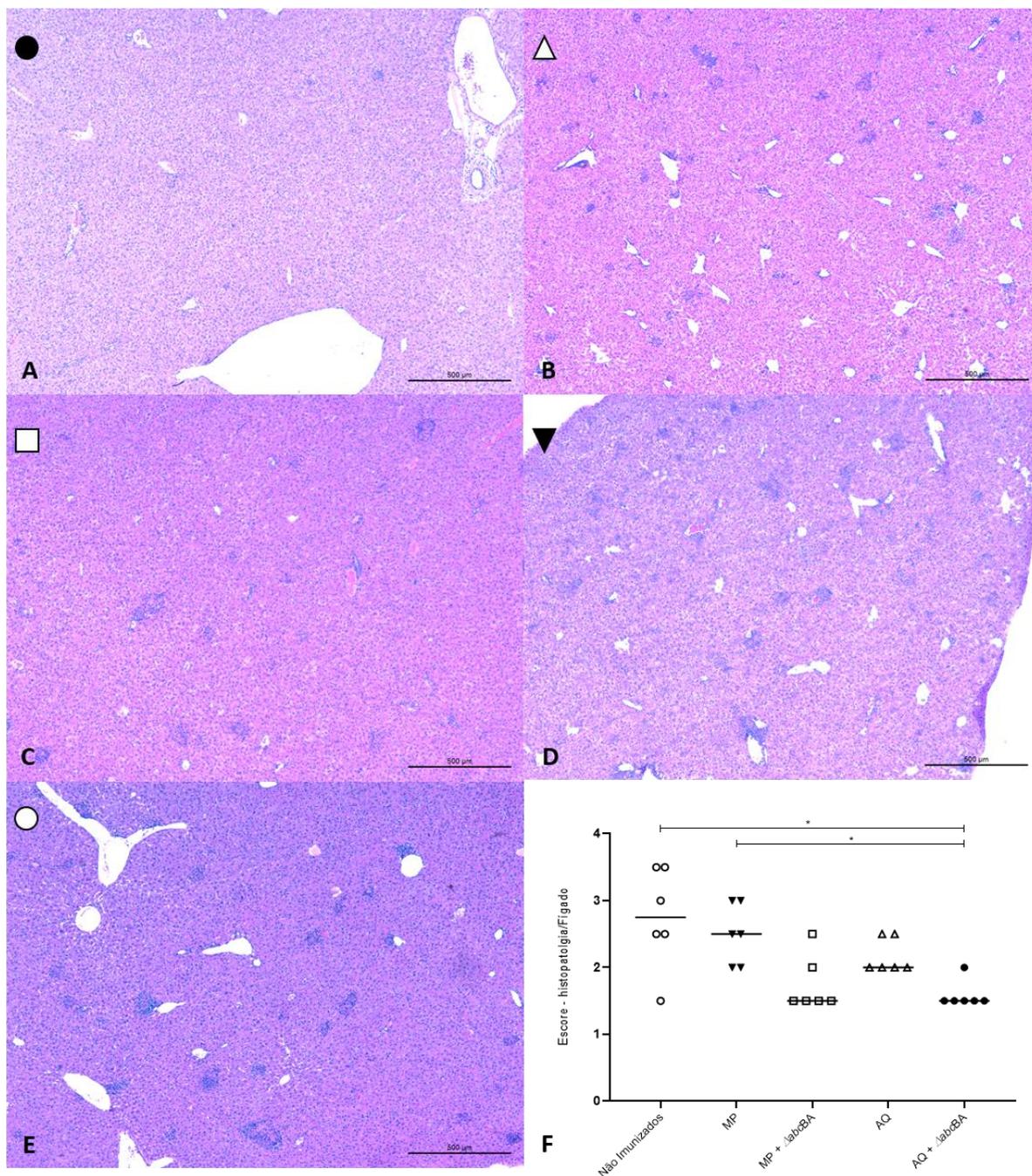


Figura 12. Avaliação histopatológica do fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=6) imunizadas por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada por alginato com quitosana (AQ+ $\Delta abcBA$) representado por círculo preto (A), AQ por triângulo vazio (B), matriz polimérica + *B. ovis* $\Delta abcBA$ (MP+ $\Delta abcBA$) quadrado vazio (C), MP por triângulo invertido preto (D) e PBS (não imunizado) círculo vazio (E). Os dados são expressos em animais individuais (pontos) e a mediana (F). Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível observar que camundongos C57BL/6 imunizados por via subcutânea, com *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsuladas por alginato e quitosana, apresentaram redução da colonização bacteriana em baço e fígado após o desafio com estirpe selvagem de *B. ovis*, além de induzir a produção de anticorpos que auxiliam tanto na resposta imune humoral quanto celular.

Diante das características demonstradas por esta estirpe vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$, de ser segura e eficaz tanto no modelo murino quanto no hospedeiro natural (Silva et al., 2015a e b), sustenta a vantagem de seu uso principalmente quando comparada aos riscos demonstrados por vacinas comercialmente disponíveis para o controle da brucelose, que além de causar doença nos animais apresentam risco para a saúde humana (Blasco, 1997; Ridler e West, 2011).

O encapsulamento da estirpe vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$, com alginato e quitosana apresentou um índice de proteção semelhante ao observado por trabalho com a mesma candidata a vacina encapsulada somente com alginato, qual demonstra a capacidade protetora desta estirpe em modelo murino, contra diferentes estirpes selvagens isoladas a partir de amostras de campo Carvalho et al., (2020).

Outros grupos de pesquisa demonstram que outras estirpes vacinais atenuadas de *B. ovis*, induzem uma resposta protetora significativa contra infecção por *B. ovis*, e estimulam a síntese de citocinas importantes contra a infecção por *Brucella* spp. como IFN- γ e TNF- α (Lloréns et al., 2014; Sancho et al., 2014).

A imunização com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato e quitosana induz a uma forte resposta imune humoral em camundongos desafiados com estirpe selvagem de *B. ovis*, com maior expressão de IgG1, IgG2a e IgG2b. Infecção por *Brucella* spp. induz aumento da produção de IgG com predomínio de IgG1 e IgG2a em camundongos, sendo que isotipo IgG2a, relacionada a resposta tipo Th1, tem papel importante na imunidade anti-*Brucella* (Abkar et al 2019. Shim et al., 2020).

Nos últimos anos o uso de adjuvantes vacinais tem sido mais frequente em preparações vacinais contra brucelose, apesar da grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura demonstrarem seu uso em vacinas inativadas ou de subunidades (Ibañez et al., 2015; Nejad et al., 2019). Contudo, segundo alguns autores, os melhores resultados no controle da infecção por *Brucella* se dá através da utilização de estirpes vivas atenuadas (Ko e Splitter, 2003; Olsen e Stoffregen, 2005; Dorneles et al., 2015). Há estudos que utilizam adjuvantes associados a vacinas vivas atenuadas de *Brucella* spp., com intuito de

prolongar a persistência da cepa atenuada no hospedeiro e melhorar a resposta imunológica e proteção contra a estirpe selvagem em hospedeiros naturais (Silva et al., 2015b; Eckstein et al., 2020; Castaño-Zubieta et al., 2021).

Biopolímeros têm sido cada vez mais utilizados como adjuvantes, e se mostram biocompatíveis, estáveis e seguros (Golshani et al., 2018; Sadeghi et al., 2019). O alginato é um biopolímero usado como adjuvante de vacina viva (Silva et al., 2015 a e b; Eckstein et al., 2020; Costa et al., 2020; Castaño-Zubieta et al., 2021) ou subunidades (Ibañez et al., 2015; Shim et al., 2020) com intuito de melhorar a capacidade protetora da vacina. Microcápsulas de biopolímeros servem como um sistema de entrega de antígenos, protegendo-os da degradação, conduzindo a uma liberação mais lenta aumentando a disponibilidade de imunógenos, além de melhorar captação por células apresentadoras de antígenos, conduzindo a uma resposta imune mais organizada e duradoura (Rice-Ficht et al., 2010; Kashem et al., 2017; Abkar et al., 2019).

A utilização de adjuvantes associados tem-se mostrado eficaz na indução resposta imune. Neste estudo utilizamos a associação de dois adjuvantes para a preparação da vacina, alginato e quitosana, que favoreceram resposta protetora e redução das lesões ocasionadas pela infecção por *Brucella ovis*. Rocha et al., (2021), avaliaram microcápsulas de alginato e quitosana em vacina inativada em modelo murino de infecção contra *Listeria monocytogenes*, e observaram que o uso do biopolímeros induzem proliferação de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺, além de níveis significativos de IFN- γ , importantes para o controle da infecção de bactérias intracelulares. Adicionalmente a associação de alginato com quitosana reduziu as lesões hepáticas causadas pela listeriose em modelo murino (Rocha et al., 2021).

Está claro que a utilização de adjuvantes apresenta diversas vantagens como, possibilitar uma resposta imune mais eficaz e duradoura, permitir praticidade de seu uso, contudo, alguns adjuvantes podem apresentar desvantagens que impossibilitem sua aplicação, como por exemplo aumentar o custo da produção de vacinas, além de algumas destas soluções conduzirem a quadros reação inflamatória exacerbada no local da aplicação como ocorre no caso de adjuvante de Freud (Windsor et al., 2005; Windsor e Eppleston, 2006). É importante a busca contínua de novas formulações que induzam uma menor reatogenicidade (Stills Jr, 2005; Powers et al., 2007) sem prejudicar sua capacidade imunoestimulatória. Neste estudo os camundongos que receberam AQ+ *B. ovis* $\Delta abcBA$, exibiram uma reação inflamatória local em alguns casos com formação de fístulas

demonstrando a necessidade de refinar ainda mais o preparo de vacinas com estas substâncias.

7. CONCLUSÃO

Este conjunto de resultados obtidos com estes experimentos, evidenciam a possibilidade da utilização de biopolímeros, em preparações únicas ou associadas, como microcápsulas ou somente veículo como adjuvantes vacinais. Os biopolímeros mostraram-se biocompatíveis e seguros para uso animal, além de a associação entre *B. ovis* $\Delta abcBA$ e cápsulas formadas a partir de alginato e quitosana, conduzirem tanto a maior índice de proteção, bem como induzir a produção significativa de anticorpos relacionados a resposta imune protetiva, tornando possível sua avaliação futura em hospedeiro natural. A Matriz Polimérica embora não tem favorecido a proteção vacinal conferida pela estirpe *B. ovis* $\Delta abcBA$, apresenta inocuidade no modelo murino e características físico-químicas que podem permitir sua utilização como adjuvante vacinal que atue como um sistema de entrega de antígenos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABKAR, M.; ALAMIANB, S.; SATTARAHMADY, N. A. Comparison between adjuvant and delivering functions of calcium phosphate, aluminum hydroxide and chitosan nanoparticles, using a model protein of *Brucella melitensis* Omp31. *Immunol. Lett.*, v.207, p.28 – 35, 2019.

ABKAR, M.; FASIHI-RAMANDI, M.; KOOSHKI, H. et al. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. *Int. J. Nanomed.*, v.12, p.8769 – 8778, 2017.

ABKAR, M.; LOTFI, A.S.; AMANIA, J. et al. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: influence of nanoparticulation versus traditional immunization. *Vet. Res. Commun.*, v.39, n.4, p.217-228, 2015.

ALI, A.; DERAR, R.D.; OSMAN, S.A. et al. Scrotal enlargement in rams and bucks in Qassim region, central of Saudi Arabia: clinical and ultrasonographic findings and seroprevalence of brucellosis. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.51, p.2109-2114, 2019.

ALLEN, A.; BREADON, E.; BYRNE, A. et al. Molecular Epidemiology of *Brucella abortus* in Northern Ireland—1991 to 2012. *PLoS One.*, v.10, n.9, p.1-23, 2015.

ALVAREZ, L.P.; VILLALOBOS, N.R.; ESQUIVEL, M.S. et al. Molecular characterization of *Brucella ovis* in Argentina. *Vet. Microbiol.*, v.245, p.1-5, 2020.

ARAPOVIĆ, J.; ŠPIČIĆ, S.; DUVNJAK, S. et al. The first report of *Brucella melitensis* Rev.1 human brucellosis in Bosnia and Herzegovina., *J. Infect. Dev. Ctries.*, v.14, n.2, p.232-235, 2020.

ARENAS-GAMBOA, M.; FICHT, T. A.; KAHL-MCDONAGH, M. M. et al. The *Brucella abortus* S19 Δ vjbR live candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type vaccine challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infect. Immun.*, v. 77, p. 877-884, 2009.

ASÍN, J.; MOLÍN, J.; PÉREZ, M. et al. Granulomas following subcutaneous injection with aluminum adjuvant-containing products in sheep. *Vet. Pathol.*, v.56, n.3, p.418-428, 2019.

BAROUCH, D.H.; TOMAKA, F.L.; WEGMANN, F. et al. Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19). *Lancet.*, v.392, n.10143, p.232-243, 2018.

BÉGUÉ, P.; GIRARD, M.; BAZIN, H.; JEAN-FRANÇOIS, B. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. v.196, ed. 6, p.1177-1181, 2012.

BLASCO, J.M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, v. 31, p.275-283, 1997.

BLASCO, J.M.; MOLINA-FLORES, B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.*, v.27, n.1, p.95-104, 2011.

BONFINI, B.; CHIARENZA, G.; PACI, V. et al. Cross-reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella* spp. *Vet. Ital.*, v.54, n.2, p.107-114, 2018.

BOSILKOVSKI, M.; KAMILOSKI, V.; MISKOVA, S. et al. Testicular infection in brucellosis: Report of 34 cases. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v.51, n.1, p.82-87, 2018.

BRANSCOM, L.A.; CORNISH, T.E.; SONDGEROTH, K.S. Evaluation of serologic testing of rams in the management of *Brucella ovis* in a domestic sheep flock. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.31, n.1, p.86 - 89, 2019.

BRUCE, D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *The Practitioner.*, v.39, n.3, p.161 - 170, 1887.

BRUNNER, R.; JENSEN-JAROLIM, E.; SCHÖLL, I.P. The ABC of clinical and experimental adjuvants - a brief overview. *Immunol. Lett.*, v.128, n.1, p.29 - 35, 2010.

BURGESS, G. W. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.551-575, 1982.

BURGESS, G.W.; SPENCER, T.L.; NORRIS, M.J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.62, n.8, p.262 - 264, 1985.

CARVALHO JÚNIOR, C.A.; MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N. et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin. Res.*, v.102, p.213 - 222, 2012.

CARVALHO, P.T.; 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* $\Delta abcBA$ against *B. ovis* field isolates in mice. *Pesq. Vet. Bras.*, v.40, n.2, p.88 - 96, 2020.

CARVALHO, R.F.B.; SANTOS, H.P.; MATHIAS, L.A. et al. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.83, p.1 - 6, 2016.

CASALLAS, J.C.G.; MONSALVE, W.V.; VILLATE, S.C.A. et al. Acute liver failure complication of brucellosis infection: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.*, v.12, n.62, p.1 - 5, 2018.

CASTAÑO-ZUBIETA, M.R.; ROSSETI, C.A.; GARCÍA-GONZÁLES, D.G. et al. Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MDyjbR strain in goats. *Vaccine*, v.39. n.3, p.617 - 625, 2021.

CELLI, J. The intracellular life cycle of *Brucella* spp. *Microbiol. Spectr.*, v.7, n.2, p. 1 - 11, 2019.

CELLI, J.; CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M. et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.198, n.4, p.545 - 56, 2003.

CHEVILLE, N.F.; A E JENSEN, A.E.; HALLING, S.M.; TATUM, F.M. et al., Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v.3, n.10, p.1881 - 1888, 1992.

CHISHOLM, C.F.; KANG, T.J.; DONG, M. et al. Thermostable ebola virus vaccine formulations lyophilized in the presence of aluminum hydroxide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.136, p.213–220, 2019.

CLAASSEN, E.; LEEUW, W.; GREEVE, P. et al. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Res. Immunol.*, v.143, n.5, p.478-483, 1992.

CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; ANDRÉSIBAÑEZ, A.E. et al. Evaluation of the efficacy of Outer Membrane Protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c Mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, n.12, p.1689 - 1694, 2014.

COPIN, R.; VITRY, M.A.; MAMBRES, D.H. et al. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathog.*, v.8, n.3, p.1 - 18, 2012.

CORBEL, M. J. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization and World Organization for Animal Health. *Brucellosis in humans and animals.*, 2006. 86p.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus *Brucella*. In: Williams and Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore, v.1, p.377 - 388, 1984.

COSTA, E.A.; SANT'ANA, F.M.; CARVALHO, C.J.S. et al. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the State of Piauí. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.3, p.751 - 754, 2012.

COSTA, L.F.; CABELLO, A.L.; BATISTA, D.F.A. et al. The candidate vaccine strain *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ is protective against *Brucella melitensis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, v.11, n.64, p.730 - 736, 2020.

COSTA, L.F.; PESSOA, M.S.; GUIMARÃES, L.B. et al. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. *BMC Res. Notes.*, v.9, p.190 - 194, 2016.

DE MASSIS, F.; ZILLI, K.; DONATO, G. et al. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. *PLoS One.*, v.14, n.3, p.1 - 16, 2019.

DENISOV, A.A.; KOROBVTSEVA, Y.S.; KARPOVA, O.M. et al. Immunopotential of live brucellosis vaccine by adjuvants. *Vaccine*, v.28, p.17 - 22, 2010.

DORNELES, E.M.S.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A.P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet. Res.*, v.46, n.1, p.76 - 86, 2015.

DOUGHERTY, A.M.F.; CORNISH, T.E.; O'TOOLE, D. et al. Abortion and premature birth in cattle following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.25, n.5, p.630 - 635, 2013.

DU, X.; XUE, J.; JIANG, M. et al. A multi-epitope peptide, rOmp22, encapsulated in chitosan-PLGA nanoparticles as a candidate vaccine against *Acinetobacter baumannii* infection. *Int. J. Nanomedicine.*, v.16, p.1819-1836, 2021.

DUMKLIANG, E.; PAMORNPATHOMKUL, B.; PATROJANASOPHON, P. et al., Feasibility of chitosan-based nanoparticles approach for intranasal immunisation of live attenuated Japanese encephalitis vaccine. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.183, p.1096 -1105, 2021.

EBRAHIMPOUR, S.; BAYANI, M.; MOULANA, Z. et al. Skeletal complications of brucellosis: A study of 464 cases in Babol, Iran. *Caspian. J. Intern. Med.*, v.8, n.1, p.44 - 48, 2017.

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.*, v.15, n.4, p.1 - 20, 2020.

ELDERBROOK, M.; SCHUMAKER, B.; CORNISH, T. et al. Seroprevalence and risk factors of *Brucella ovis* in domestic sheep in Wyoming, USA. *BMC Vet. Res.*, v.15, n.1, p.246 - 257, 2019.

ELDERBROOK, M.J.; SCHUMAKER, B.A.; UETI, M.W. et al. Comparison of 2 ELISAs or detecting exposure to *Brucella ovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.32, n.5, p.700 - 705, 2020.

EL-DIASTY, M.M.; AHMED, H.A.; SAYOUR, A.E. et al. Seroprevalence of *Brucella* spp. in cattle, molecular characterization in milk, and the analysis of associated risk factors with seroprevalence in humans, Egypt. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.16, n.12, p.758 - 764, 2016.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; SANTOS, I.C.C. et al. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. *Anim. Reprod. Sci.*, v.85, p.117 - 124, 2005.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.57, p.2688 - 2693, 2007.

FOSTER, R. A.; LADDS, P. W.; BRIGGS, G. D. et al. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.*, v.64, p.248 - 250, 1987.

FRANÇA, S. A.; MOL, J. P. S.; COSTA, E. A. et al. Indirect ELISA for diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.1695-1702, 2014.

GEE, J.M.; VALDERAS M.W.; KOVACH, M.E. et al. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wildtype virulence in experimentally infected mice. *Infect. Immun.*, v.73 p.2873 - 2880, 2005.

GHERARDI, R.K.; CRÉPEAUX, G.; AUTHIER, F.J. Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system. *Autoimmun. Ver.* v.18, n.7, p.691-705, 2019.

GŁOWACKA, P.; ŻAKOWSKA, D.; NAYLOR, K. et al. *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment. *Pol. J. Microbiol.*, v.67, n.2, p.151 - 161, 2018.

GODFROID, F.; CLOECKAERT, A.; TAMINIAU, B. et al. Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M. *Res. Microbiol.*, v.151, p.655 - 668, 2000.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.*, v.36, p.313 - 326, 2005.

GOLSHANI, M.; AMANI, M.; SIADAT, S.D. et al. Comparison of the protective immunity elicited by a *Brucella* cocktail protein vaccine (rL7/L12+rTOmp31+rSOmp2b) in two different adjuvant formulations in BALB/c mice. *Mol. Immunol.*, v.103, p.306 - 311, 2018.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.281 - 297, 2002.

GOULLÉ, J.P.; GRANGEOT-KEROS, L. Aluminum and vaccines: current state of knowledge. *Med. Mal. Infect.*, v.50, n.1, p.16-21, 2020.

GRILLÓ, M.J.; BLASCO, J.M.; GORVEL, J.P. et al. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet. Res.*, v.43, n.1, p.1 - 35, 2012.

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. *Biological.*, v.28, p.119 - 127, 2000.

GRILLÓ, M. J.; MARÍN, C. M.; BARBERÁN, M. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Rec.*, v.144, p.555 - 558, 1999.

GRUBER, J.F.; NEWMAN, A.; EGAN, C. et al. *Brucella abortus* RB51 infections associated with consumption of raw milk from Pennsylvania - 2017 and 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v.69, n.15, p.482 - 483, 2020.

GWIDA, M.; EL-ASHKER, M.; MELZER, F. et al. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. *Ir. Vet. J.*, v.69, n.3, p.1 - 7, 2016.

HALLIDAY, L.C.; ARTWOHL, J.E.; BUNTE, R.M. et al. Effects of Freund's complete adjuvant on the physiology, histology, and activity of New Zealand White Rabbits. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* v.43, n.1, p.8 -13, 2004.

HAMER, I.; GOFFIN, E.; BOLLE, X. et al. Replication of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in fibroblasts does not require Atg5-dependent macroautophagy. *BMC Microbiol.*, v.14, n.223, p.1 - 9, 2014.

HANDATTU, K.; BHASKARANAND, N.; KINI, S.B. Neurobrucellosis mimicking neurotuberculosis. *Indian J. Pediatr.*, v.85, n.7, p.574, 2018.

HERNÁNDEZ-MORA, G.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; BONILLA-MONTOYA, R. et al. Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: lessons learned from failures in the control of the disease. *PLoS One.*, v.12, n.8, p.1 - 17, 2017.

HIGH, K.P.; PRASAD, R.; MARION, C.R. et al. Outcome and immune responses after *Brucella abortus* infection in young adult and aged mice. *Biogerontology*, v.8, n.5, p.583 - 593, 2007.

HIGUERA, L.D.T.A.; VELÁSQUEZ, S.D.C.J.; BAUTISTA, J.L.R. et al. Identification of *Brucella abortus* biovar 4 of bovine origin in Colombia. *Ver. Argent. Microbiol.*, v.51, n.3, p.221 - 228, 2018.

HOMSE, A.C.; CASARO, A.P.; CAMPERO, C.M. et al. Infección experimental em ovelhas por *Brucella ovis*. *Rev. Med. Vet.*, v.75. n.4, p.302 - 306, 1994.

HOPKINSON, W.I.; LLOYD, J. *Brucella ovis* in merino rams in western Australia. *Aust. Vet. J.*, v.55, p.200 - 201, 1979.

IBAÑEZ, A.E.; CORIA, L.M.; CARABAJAL, M.V. et al. A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses. *J. Control. Release.*, v.220, p.18 - 28, 2015.

IBE, M.I.; ODIMEGWUB, D.C.; ONUIGBO, E.B. Alginate-coated chitosan microparticles encapsulating an oral plasmid-cured live *Salmonella enterica* serovar Gallinarum vaccine cause a higher expression of interferon-gamma in chickens compared to the parenteral live vaccine. *Avian Pathol.*, v.48, n.5, p.423 - 428, 2019.

INAN, A.; ERDEM, H.; ELALDI, N. et al. Brucellosis in pregnancy: results of multicenter ID-IRI study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.38, n.7, p.1261 - 1268, 2019.

JENNER, D. C.; DASSA, E.; WHATMORE, A. M.; ATKINS, H. S. ATP-Binding cassette systems of *Brucella*. *Comp. Funct. Genomics.*, v.2009, p.1 - 16, 2009.

KESARWANI, A.; SAHU, P.; JAIN, K. et al. The safety and efficacy of BCG encapsulated alginate particle (BEAP) against M.tb H37Rv infection in *Macaca mulatta*: a pilot study. *Sci. Rep.*, v.11, n.1, p.1 - 10, 2021.

KO, J.; SPLITTER, G.A. *Brucella abortus* tandem repeated ATPbinding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae* LktB, are not necessary for intracellular survival. *Microb. Pathog.*, v.29, n.4, p.245 - 253, 2000.

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, p.65 - 78, 2003.

KASHEM, S.W.; HANIFFA, M.; KAPLAN, D.H. et al. Antigen-presenting cells in the skin. *Annu. Rev. Immunol.*, v.35, p.469 - 499, 2017.

KUMAR, A.; GUPTA, V.K.; MANDIL, R. et al. Interplay of oxidative stress and antioxidant bio markers in oil adjuvant *Brucella melitensis* vaccinated and challenged mice. *Vaccine*, v.37, p.3343 - 3351, 2019.

LEDWABA, M.B.; GOMO, C.; LEKOTA, K.E. et al. Molecular characterization of *Brucella* species from Zimbabwe. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.13, n.5, p.1 - 16, 2019.

LÓPEZ-GOÑI, C.; GUZMÁN-VERRI, L.; MANTEROLA, A. et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS, *Vet. Microbiol.*, v.90, p.329 - 339, 2002.

MACHADO, G.; SANTOS, D.V.; KOHEK, I. et al. Seroprevalence of *Brucella ovis* in rams and associated flock level risk factors in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Prev. Vet. Med.*, v.121, n.1, p.183 - 187, 2015.

MARIN, C.M.; BARBERAN, M.; JIMENEZ DE BAGUES, M.P. et al. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, v.48, n.2, p.209 - 215, 1990.

MCCOLLUM, M.; RHYAN, J.; COBURN, S. et al. Clinical, culture, serology, and histopathology outcomes of bighorn sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *J. Wildl. Dis.*, v.49, n.4, p.900 - 910, 2013.

MEEREN, O.V.D.; HATHERILL, M.; NDUBA, V. et al. Phase 2b controlled trial of M72/AS01E vaccine to prevent tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, v.379, n.17, p.1621 - 1634, 2018.

MENDONÇA, C.E.D.; MUNHOZ, A.D.; BEZERRA, R.A. et al. *Brucella ovis* in sheep: seropositivity and risk factors. *Cienc. anim. bras.*, v.18, p.1 - 9, 2017.

MIGUEL, R.; ASÍN, J.; RODRÍGUEZ-LARGO, A. et al. Detection of aluminum in lumbar spinal cord of sheep subcutaneously inoculated with aluminum-hydroxide containing products. *J. Inorg. Biochem.*, v.204, p.110871, 2020.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.*, v.5, p.1 - 18, 2014.

MOUSAVI, T.; SARAVI, S.S.; VALADAN, R. et al. Different types of adjuvants in prophylactic and therapeutic human papillomavirus vaccines in laboratory animals: a systematic review. *Arch. Virol.*, v.165, n.2, p.263-284, 2020.

MOUSTACAS, V. S.; SILVA, T. M.; COSTA, L. F. et al. Clinical and pathological changes in rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *Sci. W. J.*, v.27, p.1 - 10, 2014.

NAZIFI, N.; TAHMOORESPUR, M.; SEKHAVATI, M.H. et al. In vivo immunogenicity assessment and vaccine efficacy evaluation of a chimeric tandem repeat of epitopic region of OMP31 antigen fused to interleukin 2 (IL-2) against *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *BMC Vet Res.*, v.15, n.402, p.1 - 11, 2019.

NEJAD, R.B.; YAHYARAEYAT, R.; ES-HAGHI, A. et al. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.*, v.127, p.797 - 804, 2019.

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A. et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol.*, v.33, n.6, p.1210 - 1220, 1999.

OLSEN, S.C.; STOFFREGEN, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines*, v.4, n.6, p.915 - 928, 2005.

O'MEARA, S.; JAMES, M.M.; ADDERLEY, U.J. Alginate dressings for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst. Rev.*, v.2015, n.8, p.CD010182, 2015.

OSBURN, B.I.; KENNED, P.C. Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Path. Vet.*, v.3, p.110 - 136, 1966.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M. et al. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.*, v.352, p.2325 - 2336, 2005.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, v.6, n.2, p.91 - 99, 2006.

PAUL, S.; PEDDAYELACHAGIRI, B.V.; NAGARAJ, S. et al. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model. *Mol. Immunol.*, v.99, p.9 - 18, 2018.

PERKINS, S.D.; SMITHER, S.J.; ATKINS, H.S. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.34, p.379 - 394, 2010.

PETROVIĆ, M.; ŠPIČIĆ, S.; POTKONJAK, A. et al. First evidence of *Brucella ovis* infection in rams in the Pirot Municipality, Serbia. *Vet. Ital.*, v.50, n.4, p.259 - 268, 2014.

PICARD-HAGEN, N.; BERTHELOT, X.; CHAMPION, J.L. et al. Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Vet. Res.*, v.30, n.11, p.125 - 131, 2015.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.32, n.1, p.105 - 115, 2013.

PONSART, C.; RIOU, M.; LOCATELLI, Y. et al. *Brucella melitensis* Rev.1 vaccination protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. *PLoS One*, v.15, n.4, p.1 - 20, 2020.

REED, S.G.; ORR, M.T.; FOX, C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.*, v.19, n.12, p.1597 - 608, 2013.

RETAMAL-DÍAZ, A.; RIQUELME-NEIRA, R.; SÁEZ, D. et al. Use of S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R) - propyl]-R-cysteiny] - amidomonomethoxy polyethylene glycol as an adjuvant improved protective immunity associated with a DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* in mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, n.11, p.1474 - 1480, 2014.

RICE-FICHT, A.C; ARENAS-GAMBOA, A.M.; KAHL-MCDONAGH, M. M. et al. A polymeric particles in vaccine delivery. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.13, p.106 - 112, 2010.

RIDLER, A. L.; WEST, D. M. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.27, n.1, p.61 - 66, 2011.

RIDLER, A. L.; WEST, D. M.; STAFFORD K. J. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. *N. Z. Vet. J.*, v.48, p.57 - 59, 2000.

RIS, D.R. The complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in sheep. *N. Z. Vet. J.*, v.22, n.8, p.143 - 146, 1974.

ROCHA, C.E.V.; SILVA, M.F.; GUEDES, A.C.B. et al. Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. *In.t J. Biol. Macromol.*, v.10, n.176, p.567 - 577, 2021.

RODRIGUÉZ, A.M.; DELPINO, M.V.; MIRAGLIA, M.C. et al. *Brucella abortus*-activated microglia induce neuronal death through primary phagocytosis. *Glia*, v.65, n.7, p.1137 - 1151, 2017.

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. *Infect. Immun.*, v. 70, p.5036 - 5044, 2002.

SABZI, F.; FARAJI, R. A rare case of anterior mediastinal mass caused by *Brucella* infection. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.*, v.25, n.3, p.222 - 225, 2017.

SABZI, F.; HEIDARI, A.; FARAJI, R. Right ventricular outflow tract endocarditis caused by brucellosis. *J. Infect. Public Health.*, v.10, n.5, p.678 - 680, 2017.

SADEGHI, Z.; FASIHI-RAMANDI, M.; AZIZI, M. et al. Mannosylated chitosan nanoparticles loaded with FliC antigen as a novel vaccine candidate against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. *J. Biotechnol.*, v.20, n.310, p.89 - 96, 2020.

SADEGHI, Z.; FASIHI-RAMANDI, M.; BOUZARI, S. Evaluation of immunogenicity of novel multi-epitope subunit vaccines in combination with poly I:C against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. *Int Immunopharmacol.*, v.75, p.1 - 9, 2019.

SANCHO, P.; TEJEDOR, C.; SIDHU-MUÑOS, R.S. et al. Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Vet. Res.*, v.45, n.1, p.61 - 71, 2014.

SANTOS, F.A.; HIGINO, S.S.S.; AZEVEDO, S.S. et al. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em ovinos deslançados do semiárido paraibano. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, n.4, p.459 - 463, 2013b.

SANTOS, R. L.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P. Infecção por *Brucella ovis*. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, v.47, p.42 - 56, 2005.

SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M. et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, n.6, p.759 - 764, 2013a.

SAUNDERS, V. F.; REDDAKLIFF, L. A.; BERG, T. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.*, v.85, n.1, p.72 - 77, 2007.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.58, n.2, p.375 - 382, 2008.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.60, n.4, 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*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.66, n.5, p.2090 - 2098, 2016.

SERGEANT, E. S. G. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. *N. Z. Vet. J.*, v.42, p.97 - 100, 1994.

SHEHABI, A.; SHAKIR, K.; EI-KHATEE, M. et al. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. Infect.*, v.20, p.5 - 10, 1990.

SHIM, S.; SOHA, S.H.; IM, Y.B. et al. Elicitation of Th1/Th2 related responses in mice by chitosan nanoparticles loaded with *Brucella abortus* malate dehydrogenase, outer membrane proteins 10 and 19. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.310, p.1 - 10, 2020.

SILVA, A.P.C.; MACÊDO, A.A.; SILVA, T.M. et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated $\Delta abcBA$ strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, p.789 - 97, 2015a.

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.*, v.10, p.1 - 18, 2015b.

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. *Vet. Microbiol.*, v.67, p.546-553, 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. *Infect. Immun.*, v.79, p.1706 - 1717, 2011.

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.*, v.12, p.1 - 27, 2014.

SINGH, D.; SOMANI, V.K.; AGGARWAL, S. et al. PLGA (85:15) nanoparticle based delivery of rL7/L12 ribosomal protein in mice protects against *Brucella abortus* 544 infection: A promising alternate to traditional adjuvants. *Mol. Immunol.*, v.68, p.272 - 279, 2015.

SOH, S.H.; SHIM, S.; IM, Y.B. et al. Induction of Th2-related immune responses and production of systemic IgA in mice intranasally immunized with *Brucella abortus* malate dehydrogenase loaded chitosan nanoparticles. *Vaccine*, v.37, n.12, p.1554 - 1564, 2019.

SOUZA, T.D.; CARVALHO, T.F.; MOL, J.P.S. et al. Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine fetuses and neonates. *Sci. Rep.*, v.8, n.1, p.1 - 10, 2018.

SOLER-LLORENS, P.; GIL-RAMÍREZ, Y.; ZABALZA-BARANGUÁ, A. et al. Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Vet. Res.*, v.45, n.1, p.72, 2014.

STILLS JR, H.F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Ilar J.* v.46, n.3, p.280 - 293, 2005.

TORRÉNS, I.; MENDOZA, O.; BATTE, A. et al. Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicated established human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumors. *Vaccine.*, v.23, n.50, p.5768 - 5774, 2005.

VIGLIETTI, A.I.P.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; QUARLERI, J. et al. *Brucella abortus* infection modulates 3T3-L1 adipocyte inflammatory response and inhibits adipogenesis. *Front. Endocrinol.*, v.18, n.11, p.1 - 12, 2020.

WEST, D. M.; STAFFORD, K. J.; ALLEY, M. R. et al. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. *N. Z. Vet. J.*, v.41, p. 82 - 86, 1993.

WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAER, A. et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.64, p.4120 - 4128, 2014.

WINDSOR, P.A.; BUSH, R.; LINKS, I et al. Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* v.83, n.4, p.216-220, 2005.

WINDSOR, P.A.; EPPLESTON, J. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N. Z. Vet. J.*, v.54, n.5, p.237 - 241, 2006.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A. et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciênc. Rural.*, v.39, n.7, p.2252 - 2260, 2009.

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. *Vet. Microbiol.*, 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1016 - 1021, 2011.

ZHANG, B.; YAO, H.; QI, H. et al. Trehalose and alginate oligosaccharides increase the stability of muscle proteins in frozen shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Funct.*, v.11, n.2, p.1270-1278, 2020.

ZRIBA, S.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; KHALAF, O.H. et al. Vaccine safety studies of *Brucella abortus* S19 and S19 Δ vjbR in pregnant swine. *Vaccine X.*, v.22, n.3, p,1 - 8, 2019.