

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Laice Alves da Silva

**AVALIAÇÃO DE ADJUVANTES PARA FORMULAÇÃO DE VACINA *BRUCELLA*
OVIS GAMA-IRRADIADA EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO POR
*BRUCELLA OVIS***

Belo Horizonte

2022

Laice Alves da Silva

**AVALIAÇÃO DE ADJUVANTES PARA FORMULAÇÃO DE VACINA *BRUCELLA*
OVIS GAMA-IRRADIADA 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 parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Alves da Paixão

Belo horizonte

2022

S586a Silva, Laice Alves da, 1993-
Avaliação de adjuvantes para formulação de vacina *Brucella Ovis* gama-irradiada em modelo murinho de infecção por *Brucella Ovis* /Laice Alves da Silva . – 2022.
60f.:il.

Orientador: Renato de Lima Santos
Coorientadora: Tatiane Alves da Paixão
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Patologia animal.
Bibliografias: f. 51 a 60.

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

CDD – 636.089 69

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



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAICE ALVES DA SILVA

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

Aprovado(a) em 22 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Renato de Lima Santos - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Humberto de Melo Brandao

Dr.(a). Tatiane Furtado de Carvalho



Documento assinado eletronicamente por Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior, em 22/02/2022, às 11:21, 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 Mello Brandão, Usuário Externo, em 22/02/2022, às 11:52, 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 Tatiane Furtado de Carvalho, Usuária Externa, em 22/02/2022, às 12:06, 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 1256433 e o código CRC 464F8E6F.

Dedico aos meus pais, Edna Alves do Carmo Silva e Lauro Antônio Dias da Silva, pelo exemplo de dignidade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre guiar meus caminhos.

À minha família, pelo incentivo aos estudos e apoio incondicional.

Ao meu noivo Tiago, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador Professor Dr. Renato de Lima Santos e minha coorientadora Professora Dra. Tatiane Alves da Paixão, pela confiança, valiosos ensinamentos e contribuições ao longo de todo o processo.

Aos amigos e colegas do Laboratório 312, em especial, à Andressa, Monique, Clarissa, Thaynara e Jefferson, que generosamente me acolheram e auxiliaram em diversas etapas dos experimentos, compartilhando experiências e conhecimentos. Obrigada também aos demais colegas: Lucas, Paulo, Ayisa, Pâmela, Daniel, Samantha, Thaís e Patrícia, pelo convívio, troca de ideias e cooperação mútua.

Aos amigos da Pós-graduação, sobretudo, Maira e Douglas, pela amizade e coleguismo durante esses últimos anos.

Gratidão aos professores da Patologia Veterinária e a todos aqueles que fizeram parte da minha trajetória acadêmica, pela enorme colaboração para minha formação e por terem deixado suas marcas em meu coração e mente.

À Escola de Veterinária da UFMG, por ser um ambiente inspirador e pela oportunidade de conhecer e conviver com profissionais excelentes e admiráveis.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos durante todo o mestrado.

“A primavera chegará, mesmo que ninguém mais saiba seu nome, nem acredite no calendário,
nem possua jardim para recebê-la.”

Cecília Meireles

RESUMO

A brucelose é uma doença infecciosa causada por bactérias cocobacilares, Gram-negativas, intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella*. A brucelose ovina, cujo um dos agentes etiológicos é a *Brucella ovis*, provoca perdas reprodutivas e econômicas em rebanhos ovinos amplamente distribuídos pelo mundo. A vacinação desses animais representa um método eficiente para o controle da infecção nos países onde a incidência é considerada elevada. Vacinas inativadas, embora mais seguras, podem resultar em respostas imunes insuficientes ou de baixa eficácia e/ou persistência. O objetivo desse estudo foi avaliar a associação de uma vacina gama irradiada *Brucella ovis* ATCC 25840 a diferentes adjuvantes como estratégia para ampliar sua imunogenicidade e proteção. Os biopolímeros alginato e quitosana, bem como a emulsão Montanide ISA 61 demonstraram incitar uma resposta local intensa e duradoura, sobretudo, quando associados ao antígeno. Contudo, o Montanide ISA 61 apresentou menor reatogenicidade quando comparado aos demais. Além disso, as formulações vacinais *B. ovis* γ -irradiada revestida por cápsulas de alginato-quitosana e *B. ovis* γ -irradiada associada a Montanide ISA 61 induziram concentrações elevadas de IgG2b, importante marcador de resposta imune celular. Todavia, essas formulações falharam em conferir imunidade protetora aos camundongos desafiados experimentalmente com a estirpe virulenta de *B. ovis*.

Palavras-chave: brucelose, vacinologia, adjuvantes, vacina inativada, resposta imune, camundongos.

ABSTRACT

Brucellosis is an important infectious disease caused by coccobacilli, Gram-negative, facultative intracellular bacteria member of the genus *Brucella*. Ovine brucellosis, whose etiological agent is *Brucella ovis*, causes reproductive and economic losses in ovine herds worldwide. Vaccination of these animals represents an efficient method for infection control in countries where the incidence is considered high. The inactivated vaccines, although safer, may result in insufficient or ineffective immune responses. The aim of this study was to evaluate the association of a gamma-irradiated vaccine *B. ovis* ATCC 25840 with different adjuvants as a strategy to increase its immunogenicity and protection. The alginate and chitosan biopolymers, as well as the Montanide ISA 61 emulsion have been shown to incite an intense and long-lasting local response, especially when associated with the antigen. However, Montanide ISA 61 showed lower reactogenicity when compared to the others. Furthermore, the vaccine formulations *B. ovis* γ -irradiated coated alginate-chitosan and *B. ovis* γ -irradiated associated with Montanide ISA 61 induced high levels of IgG2b, an important marker of cellular immune response. Nevertheless, these formulations failed to provide protective immunity in mice experimentally challenged with the virulent strain of *B. ovis*.

Key-words: brucellosis, vaccinology, adjuvants, inactivated vaccine, immune response, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espessura da pele no sítio de aplicação das formulações em camundongos C57BL/6 avaliada por 56 dias. Camundongos foram imunizados por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, quitosana e alginato, Montanide ISA 61 e PBS (não imunizados). Os dados representam a média da espessura da pele por grupo, no sítio de aplicação..... 36

Figura 2: Escore de lesão no sítio de aplicação de camundongos após inoculação da primeira dose. Camundongos C57BL/6 fêmeas (n=5), inoculados por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, quitosana e alginato, Montanide ISA 61 e PBS (não imunizados). Os resultados foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (** p < 0,01; *** p < 0,001). 36

Figura 3: Reações locais relacionadas à inoculação de *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato e *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 em camundongos C57BL/6. (A e F) aumento de volume na região cervical associado à presença de fistula em camundongo inoculado com *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato. (B, C e G) aumento de volume na região lombar, úlcera na região lombar e fistula drenando exsudato purulento na região cervical em camundongo vacinado com *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato. (D e H) mostram aumento de volume na região cervical associado a material branco, de superfície lisa e bem delimitado no subcutâneo de camundongo vacinado com *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 37

Figura 4: Lesões no sítio de inoculação de formulações vacinais em camundongos C57BL/6. Camundongos C57BL/6 fêmeas inoculados por via subcutânea com (A) *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, (B) *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, (C) *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, (D) quitosana e alginato, (E) Montanide ISA 61 e (F) PBS..... 38

Figura 5: Ganho de peso dos camundongos C57BL/6 fêmeas avaliado por 56 dias. Não foi observada diferença estatística entre os diferentes grupos. Os resultados foram analisados

quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. Ns $p > 0,05$ 39

Figura 6: IgG em camundongos C57BL/6. Foram determinados os títulos totais de IgG por meio de ELISAI no soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n=5) que haviam sido inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) de 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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) 40

Figura 7: Títulos de IgG1, IgG2b e IgG3 em camundongos C57BL/6. Os títulos de (A) IgG1, (B) IgG2b e (C) IgG3 foram mensurados por meio de ELISAI no soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5) que haviam sido inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) de 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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) 41 e 42

Figura 8: Títulos totais de IgM em camundongos C57BL/6. Foram determinados os títulos totais de IgM por meio de ELISAI no soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5) que haviam sido inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) da 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 (* $p < 0,05$) 43

Figura 9: Recuperação bacteriana de amostras de (A) fígado e (B) baço de camundongos C57BL/6. Camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5), foram inoculados por via subcutânea com

PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) das médias com desvio padrão. Os resultados passaram por transformação logarítmica antes de serem submetidos ao teste t-student. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$) 45

Figura 10: Fígados de camundongos C57BL/6 inoculados por via subcutânea com (A) *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, (B) *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, (C) *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, (D) quitosana e alginato, (E) Montanide ISA 61 e (F) não imunizados (PBS), posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Nas micrografias observam-se microgranulomas em todos os grupos, com agregados maiores de células inflamatórias no grupo não imunizado e nos grupos que receberam apenas os adjuvantes. H.E 40x. Na figura F observa-se também marcação imuno-histoquímica de *Brucella*. Pelo escore histopatológico (G) não houve diferença significativa entre os grupos. As medianas de cada grupo foram analisadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. $Ns p > 0,05$ 47

Figura 11: Baço de camundongos C57BL/6 inoculados com (A) *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, (B) *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, (C) *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, (D) quitosana-alginato, (E) Montanide ISA 61 e (F) não imunizados (PBS), desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Nas micrografias observam-se microgranulomas em todos os grupos, com agregados maiores de células inflamatórias no grupo não imunizado e nos grupos que receberam apenas os adjuvantes. H.E 40x. Na figura F observa-se também marcação imuno-histoquímica de *Brucella*. Pelo escore (G) não houve diferença significativa entre os grupos. As medianas de cada grupo foram analisadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. $Ns p > 0,05$ 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Hospedeiros preferencias e potencial zoonótico das espécies de *Brucella*... 19

Tabela 2: Escore de lesões do sítio de aplicação das formulações vacinais..... 31

Tabela 3: Locais de inoculação, via de administração, concentração do antígeno e volume das formulações vacinais associadas aos adjuvantes utilizados no estudo 34

Tabela 4: Proteção induzida pelas formulações vacinais *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, Quitosana + alginato e Montanide ISA 61 em camundongos C57BL/6 experimentalmente desafiados com *B. ovis*. Diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,05$) entre o grupo vacinado e o não imunizado 46

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de Variância
ELISAI.....	Ensaio Imunoenzimático Indireto
IgG.....	Imunoglobulina G
IgG1.....	Imunoglobulina G1
IgG2b.....	Imunoglobulina G2b
IgG3.....	Imunoglobulina G3
IgM.....	Imunoglobulina M
II.....	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
OD ₆₀₀	Densidade Óptica a 600 nanômetros
CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	Linfócito T CD8 ⁺
Th1.....	Linfócito T helper tipo 1
Th2.....	Linfócito T helper tipo 2
UFC.....	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. O gênero <i>Brucella</i>	18
3.2. Brucelose ovina	20
3.3. Resposta imunológica inata contra <i>Brucella</i> e fatores de virulência	21
3.4. Resposta imune protetora contra <i>Brucella</i>	22
3.5. Vacinas inativadas	23
3.6. Adjuvantes	25
3.7. Montanide	26
3.8. Quitosana e alginato	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Cepas bacterianas e cultivo	28
4.2. Preparo de <i>Brucella ovis</i> ATCC 25840 γ -irradiada	29
4.3. Encapsulamento de <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ e <i>B. ovis</i> ATCC 25840 γ -irradiada	29
4.4. Emulsificação de <i>B. ovis</i> ATCC 25840 γ -irradiada em Montanide ISA 61	30
4.5. Animais utilizados no experimento	30
4.6. Imunização dos camundongos e avaliação do índice de proteção	30
4.7. Histopatologia e imuno-histoquímica	32
4.8. Avaliação da resposta imune humoral	33
4.9. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34

5.1. As formulações vacinais <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato, <i>B. ovis</i> γ -irradiada revestida por cápsulas de quitosana e alginato e <i>B. ovis</i> γ -irradiada associada a Montanide ISA 61 incitam reação inflamatória duradoura no local da inoculação, e o Montanide ISA 61 não provoca fistulações.....	34
5.2. A imunização com <i>Brucella ovis</i> γ -irradiada encapsulada em quitosana-alginato e <i>B. ovis</i> γ -irradiada combinada a Montanide ISA 61 induzem uma forte resposta imune humoral em camundongos desafiados com estirpe virulenta de <i>B. ovis</i>	39
5.3. A vacinação com <i>Brucella ovis</i> γ -irradiada encapsulada em alginato-quitosana ou associada a Montanide ISA 61 não conferem proteção contra o desafio com estirpe virulenta de <i>B. ovis</i>	44
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose caracterizada por doença reprodutiva em animais domésticos e doença crônica e debilitante no ser humano (Corbel *et al.*, 2006). A vacinação animal provou ser a maneira mais eficiente para o controle da brucelose nos animais, impedindo assim, sua propagação para os humanos. Contudo, o desenvolvimento de vacinas contra patógenos com ciclos de vida intracelulares é desafiador, pois estes requerem uma resposta imune mediada por células (Griffiths e Khader, 2014).

Na produção ovina, a doença gera perdas reprodutivas e econômicas em rebanhos amplamente distribuídos pelo mundo, tendo como agentes etiológicos *Brucella melitensis* e *Brucella ovis*. No Brasil, a brucelose ovina é causada somente por *B. ovis*, uma vez que *B. melitensis* é considerada exótica no país (Poester *et al.*, 2013). Embora não cause doença no homem, *B. ovis* induz epididimite crônica e orquite em carneiros e constitui uma das causas mais importantes de falha reprodutiva em ovinos (Carvalho Júnior *et al.*, 2012). Além da redução de fertilidade nos machos, produz abortos ocasionais em ovelhas e aumenta o risco de mortalidade perinatal e baixo peso em cordeiros (Sancho *et al.*, 2014).

As medidas de controle para a brucelose ovina envolvem testes sorológicos, cultura bacteriológica e descarte de animais positivos. A vacinação com a cepa atenuada *Brucella melitensis* Rev1 é recomendada em locais onde a prevalência é elevada e também confere proteção contra *B. ovis*; todavia, essa vacina exhibe importantes desvantagens, incluindo virulência para humanos e proibição de seu uso em países considerados livres de *B. melitensis*, como o Brasil. Em razão do impacto econômico gerado pela brucelose ovina, esforços de pesquisa têm se concentrado no desenvolvimento de novas vacinas para o controle dessa infecção (Díaz *et al.*, 2013).

Vacinas inativadas são mais seguras que vacinas vivas atenuadas, pois, em vacinas vivas atenuadas pode ser observada reversão de virulência ou patogenicidade residual como ocorre no caso das vacinas para brucelose. Contudo, a utilização das formas inativadas pode resultar em respostas imunes não protetoras. Uma estratégia para o aumento dessa resposta nas vacinas inativadas consiste no emprego de adjuvantes vacinais, isto é, substâncias que atuem para acelerar, prolongar ou melhorar a resposta imune do hospedeiro ao antígeno (Yan *et al.*, 2019). Além disso, bactérias inativadas por radiação gama não se replicam, mas

permanecem metabolicamente ativas, representando também alternativa viável para fins de imunização (Dabral *et al.*, 2014).

O modelo murino tem sido amplamente utilizado nos estudos de brucelose, o que é extremamente importante devido às limitações com as experimentações envolvendo animais de grande porte. Nessas espécies, embora a maioria dos órgãos do sistema reticuloendotelial possa estar infectada, o baço e o fígado costumam ser predominantemente afetados e a imunidade protetora parece ser mediada por mecanismos efetores humorais e celulares. Em particular, estudos *in vivo* indicam que uma resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é importante para controlar a infecção (Silva *et al.*, 2011; Grilló *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015a). Nesse estudo, avaliamos a associação de diferentes adjuvantes a *B. ovis* ATCC 25840 gama-irradiada, analisando a imunogenicidade e proteção conferida pelas formulações no modelo murino de infecção por *B. ovis*.

2. OBJETIVO GERAL

Selecionar o melhor adjuvante para a formulação com a estirpe *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada e avaliar se essa associação confere proteção e imunogenicidade em camundongos desafiados experimentalmente com a estirpe virulenta *B. ovis* ATCC 25840.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de proteção conferido pelas formulações vacinais *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada revestida por cápsulas de alginato-quitosana ou associada a Montanide ISA 61, comparando-as com a estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato, em camundongos desafiados experimentalmente com a estirpe virulenta de *B. ovis* ATCC 25840.
- Avaliar as reações locais nos sítios de inoculação das formulações vacinais associadas aos adjuvantes.
- Avaliar os títulos de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses (IgG1, IgG2b e IgG3) induzidos pelas associações dos adjuvantes a *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O gênero *Brucella*

Brucella spp. são cocobacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos e não encapsulados pertencentes à classe das α -proteobactérias. Algumas dessas espécies são agentes causadores da brucelose, uma zoonose responsável por grandes perdas econômicas na pecuária e graves problemas na saúde pública (Santos *et al.*, 2013; Dabral *et al.*, 2019).

Esses microorganismos infectam grande variedade de mamíferos aquáticos e terrestres incluindo suínos, bovinos, ovinos, caprinos e caninos além de cetáceos, focas e ratos do deserto. Tradicionalmente, o gênero *Brucella* era composto por seis espécies agrupadas conforme sua patogenicidade e predileção primária pelo hospedeiro. Todavia, recentes isolados bacterianos foram reconhecidos e o gênero passou a ser constituído pelas seguintes espécies: *Brucella melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. inopinata*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. vulpis* e *B. papionis*. Recentemente foi isolada uma nova espécie de *Brucella* em sapo africano (*Pyxicephalus edulis*), com RNA ribossomal 16S de *B. inopinata*, apesar de perfil bioquímico similar ao de *Ochrobactrum* sp. (Paixão *et al.*, 2009; Eisenberg *et al.*, 2012; Hofer *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2015).

Os hospedeiros preferenciais de *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus* são os pequenos ruminantes, suínos e bovinos, respectivamente, sendo essas também as espécies mais patogênicas ao ser humano. *B. canis* infecta os cães e ocasionalmente causa doença no homem. *B. ovis* tem o ovino e *B. neotomae*, o rato do deserto como hospedeiros preferenciais. *B. ovis* não causa brucelose humana; *B. neotomae* pode infectar humanos. As espécies *B. pinnipedialis* e *B. ceti* também podem infectar o homem e têm como hospedeiros de predileção focas e cetáceos, respectivamente. *B. microti* foi isolada em animais silvestres e ratazanas e *B. inopinata* foi identificada em um implante mamário infectado. *B. vulpis* foi isolada no linfonodo de uma raposa vermelha e *B. papionis* no útero de babuínos, não existindo ainda informações sobre o potencial zoonótico dessas espécies (**Tabela 1**) (Paixão *et al.*, 2009; Pappas, 2010; Hofer *et al.*, 2012; Suárez-Esquível *et al.*, 2017).

Tabela 1: Hospedeiros preferencias e potencial zoonótico das espécies de *Brucella*.

Espécies	Hospedeiros preferenciais	Potencial zoonótico
<i>Brucella melitensis</i>	Ovinos, caprinos.	Elevado
<i>Brucella abortus</i>	Bovinos	Moderado
<i>Brucella suis</i>	Suínos	Moderado
<i>Brucella canis</i>	Caninos	Leve
<i>Brucella ceti</i>	Golfinhos e baleias	Leve
<i>Brucella pinnipedialis</i>	Focas	Leve
<i>Brucella neotomae</i>	Ratos do deserto	Leve
<i>Brucella inopinata</i>	Não conhecido	Leve
<i>Brucella ovis</i>	Ovinos	Infecções não reportadas
<i>Brucella microti</i>	Ratazanas	Infecções não reportadas
<i>Brucella papionis</i>	Babuínos	Infecções não reportadas
<i>Brucella vulpis</i>	Raposa vermelha	Infecções não reportadas
<i>Brucella</i> sp.(sapo africano)	Sapo africano	Infecções não reportadas

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Brucella* são altamente similares, apresentando similaridades genômicas superiores a 90% em suas sequências de nucleotídeos. Essas bactérias são exigentes e crescem com atividade metabólica limitada (Hammerl *et al.*, 2016).

Brucella spp. podem ser também divididas segundo a composição do lipopolissacarídeo (LPS). As espécies de *Brucella* lisa (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*) possuem um O-polissacarídeo (O-PS) constituindo seu LPS, diferentemente das espécies naturalmente rugosas (*B. ovis* e *B. canis*) que não exibem esse O-PS. Esse componente é imunodominante e os animais infectados com espécies de *Brucella* lisas desenvolvem anticorpos contra O-PS. Entretanto, tal como ocorre em outras infecções por patógenos intracelulares, a imunidade celular desempenha papel central na resistência adquirida contra a doença (Dabral *et al.*, 2019).

3.2. Brucelose ovina

A brucelose ovina provoca perdas reprodutivas e econômicas em rebanhos ovinos amplamente distribuídos pelo mundo, tendo como agentes etiológicos a *B. melitensis* e a *B. ovis*. No Brasil a doença é causada somente por *B. ovis*, uma vez que *B. melitensis* é considerada exótica no país (Poester *et al.*, 2013). A infecção natural por *B. ovis* ocorre principalmente em ovinos, embora haja relatos de infecção em cervídeos e caprinos (Ridler *et al.*, 2000). O estudo de Costa *et al.* (2016) demonstrou evidências sorológicas de infecção natural por *B. ovis* em caprinos mesmo na ausência de ovinos.

A transmissão venérea tem importância na doença causada por *B. ovis* que cursa com epididimite em carneiros, e, menos frequentemente, com placentite e aborto em ovelhas. *Brucella ovis* não causa doença humana, mas pode induzir doença crônica em ovinos. Alguns carneiros infectados por *B. ovis* apresentam assimetria da cauda do epidídimo, associado à sensibilidade escrotal. Ao exame ultrassonográfico, são visualizados nódulos anecoicos na cauda do epidídimo (Carvalho Júnior *et al.*, 2012; Elderbrook *et al.*, 2019).

Microscopicamente, se observam epididimite, degeneração testicular e vesiculite seminal. Em infecção experimental pela via de inoculação subcutânea, foi constatada epididimite granulomatosa com diferentes graus de intensidade. As lesões iniciais progrediram para fibrose intersticial e degeneração epididimária com formação de cistos intra-epiteliais levando, por vezes, à ruptura do ducto epididimário, extravasamento de espermatozoides para o interstício e formação de granuloma espermático (Carvalho Júnior *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015b).

Não há vacina disponível especificamente contra *B. ovis*. A vacina Rev-1, derivada de uma cepa viva atenuada de *B. melitensis*, é a mais comumente utilizada contra *B. melitensis* e também protege contra *B. ovis*. No entanto, existem limitações significativas associadas ao seu uso como a interferência em testes sorológicos, indução de aborto em animais gestantes, patogenicidade residual, resistência à estreptomicina (um dos antibióticos de escolha para o tratamento da brucelose humana) e proibição do uso em países considerados livres da doença, como o Brasil (Silva *et al.*, 2015b; Cassatro *et al.*, 2016).

Estudos recentes demonstraram que a cepa vacinal candidata *B. ovis* $\Delta abcBA$ induz proteção em camundongos (Silva *et al.*, 2015a), e promove imunidade estéril em carneiros experimentalmente desafiados (Silva *et al.*, 2015b). Em camundongos, índices de proteção

mais elevados foram induzidos pela cepa vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$ em camundongos C57BL/6 em comparação a camundongos BALB/c (Silva *et al.*, 2015a).

3.3. Resposta imunológica inata contra *Brucella* e fatores de virulência

As espécies de *Brucella* apresentam forte tropismo e se multiplicam em macrófagos, células dendríticas e trofoblastos. Para alcançar as células-alvo esses microorganismos atravessam as barreiras mucosas das vias respiratórias, geniturinárias e digestivas, onde são fagocitados e se disseminam para órgãos linfoides e reprodutivos. Essa fagocitose é mediada por receptores e no processo ocorre a reorganização do citoesqueleto do hospedeiro (Paixão *et al.*, 2009; Rossetti *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2015).

O sistema regulador *BvsR/BvrS* realiza o recrutamento de GTPases e filamentos de actina, além de contribuir para a manutenção da integridade externa dos microorganismos. Cepas mutantes com ausência desse sistema são incapazes de invadir células-alvo e impedir a união do fagossomo com o lisossomo (Xavier *et al.*, 2010).

Após a internalização, forma-se um compartimento denominado Vacúolo Contendo *Brucella* (BCV) onde a bactéria permanece e eventualmente se prolifera (Starr *et al.*, 2008). Roux *et al.* (2007) demonstraram que a expressão do Sistema Secretor Tipo IV (TSS4), fator de virulência codificado pelo operon *virB*, é essencial para sobrevivência e multiplicação da *Brucella* nas células de mamíferos, uma vez que impede a união do lisossomo com o fagossomo.

Grande parte das bactérias fagocitadas é destruída devido à ação microbicida de radicais livres, óxido nítrico e enzimas. Contudo, a capacidade de persistir e se replicar nas células fagocíticas do sistema reticuloendotelial e em células não fagocíticas como os trofoblastos é uma característica muito importante na infecção por *Brucella* spp. Esses microorganismos têm a capacidade de interferir no tráfego intracelular, direcionando o BCV para o retículo endoplasmático rugoso, onde ocorre intensa proliferação da bactéria (Xavier *et al.*, 2010; Poester *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2015).

A detecção de estruturas microbianas conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como o LPS, por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) que incluem receptores de membrana (Receptores Semelhantes a Toll - TLRs) e receptores citosólicos (Receptores Semelhantes a Nod - NLRs), facilita a fagocitose o que

leva à ativação de células da imunidade inata, mediadores pró-inflamatórios e moléculas que iniciam a resposta imune adaptativa. Contudo, para a *Brucella*, a atividade dos PAMPs é baixa e não resulta em resposta inflamatória de alta intensidade (Skendros *et al.*, 2011; Skendros e Boura, 2013).

Entre as citocinas pró-inflamatórias ativadas durante a infecção dos macrófagos, o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 12 (IL-12) têm papel fundamental. O TNF α aumenta fortemente a atividade bactericida dos fagócitos e a IL-12 direciona a resposta imune Th1 e estimula a produção de interferon-gama (IFN γ) pelas células *natural killers* (NK) e células T que desempenham um papel importante no controle da infecção (Paixão *et al.*, 2009; Skendros e Boura, 2013).

Algumas espécies de *Brucella* interferem na sinalização dos receptores do tipo Toll (TLRs) através da produção de proteínas que contém domínio semelhante à TIR (Receptor Toll IL-1), interferindo assim na sinalização via TLR/MyD88. Isso contribui para a supressão da imunidade inata durante a infecção, abaixando os níveis de liberação de citocinas, favorecendo a sobrevivência e persistência intracelular deste patógeno (Paixão *et al.*, 2009).

Alguns componentes externos da *Brucella* foram descritos como fatores de virulência. O LPS das colônias lisas promove proteção contra a lise mediada pelo complemento e efeitos microbicidas de células do sistema fagocítico, como lisoenzimas, óxido nítrico, radicais livres, defensinas e lactoferrinas. Assim, essas cepas são mais virulentas que as rugosas (Xavier *et al.*, 2010; Dabral *et al.*, 2019).

3.4. Resposta imune protetora contra *Brucella* spp.

A proteção contra *Brucella* depende, principalmente, da imunidade mediada por células envolvendo as células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas) e os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Após a ativação da imunidade inata, a imunidade adaptativa se expande para sustentar uma resposta específica ao antígeno visando erradicar o patógeno (Skendros *et al.*, 2011).

Citocinas são agentes-chave na resposta protetora contra *Brucella*, mediando a imunidade adaptativa e inata. A produção de interleucina 2 (IL-2) por linfócitos B e macrófagos estimula a resposta Th1 e produção de IFN γ e esse por sua vez, ativa os macrófagos. O IFN γ também estimula a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ e

potencializa a apoptose de células infectadas. Além disso, associado a IL-2, essa citocina promove a expressão de moléculas coestimuladoras e apresentadoras de antígenos em macrófagos e células dendríticas. A IL-2 é também um fator de crescimento responsável pela expansão clonal Th1 (Skendros e Boura, 2013).

Entre as citocinas relacionadas à resposta Th2 na infecção por *Brucella*, se destacam as interleucinas 10 e 6 (IL-10 e IL-6). A IL-10 é produzida por células T, linfócitos B, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Sugere-se que ao atuar em células apresentadoras de antígenos, ela iniba o desenvolvimento de resposta Th1. Uma estratégia utilizada por *B. abortus* consiste no estímulo à produção de IL-10 (Xavier *et al.*, 2013). A IL-6 também é uma citocina de resposta Th2 produzida por macrófagos ativados, células T e B, células do endotélio vascular, fibroblastos, queratinócitos e células mesangiais. Ela atua na inibição da expressão do MHC II induzida por IFN γ e na apresentação de antígenos por macrófagos infectados com *Brucella*, sugerindo desta forma, um efeito inibitório na função dos macrófagos durante a infecção *in vitro* (Paixão *et al.*, 2009).

3.5. Vacinas inativadas

O desenvolvimento de vacinas contra bactérias intracelulares demonstrou ser desafiador. Normalmente, essas vacinas precisam induzir uma série de respostas imunes, incluindo anticorpos e respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺. Essas respostas podem ser induzidas por vacinas vivas atenuadas, já o desencadeamento dessas respostas por vacinas inativadas revelou ser mais complexo (Titball, 2008). É preciso considerar, no entanto, que vacinas inativadas são formulações mais seguras, pois os riscos inerentes à replicação bacteriana podem comprometer a utilização de bactérias vivas para imunização (Yan *et al.*, 2019).

Além disso, o estudo de Carvalho *et al.*, (2020) apontou que vacinas experimentais baseadas em vacinas inativadas de *Brucella* fornecem proteção significativamente maior, conforme evidenciado por sua diferença de risco (número de animais vacinados protegidos / número total de animais vacinados – número de animais não vacinados protegidos / número total de animais não vacinados) quando comparadas às cepas de vacina atenuadas. Uma possível desvantagem das vacinas inativadas seria a não persistência da imunidade a longo prazo, que justificaria o fato de que as vacinas contra *Brucella* amplamente utilizadas são cepas vivas atenuadas.

No âmbito de vacinas inativadas, a radiação gama tem sido utilizada no desenvolvimento de formulações para prevenir doenças causadas por diferentes vírus, incluindo o SARS-CoV-2 (Karakus *et al.*, 2021); além de diversas bactérias (Cha *et al.*, 2015; Jwa *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2021) e parasitas (Gomaa *et al.*, 2019). O estudo de Hiramoto *et al.* (2002) demonstrou que o protozoário *Toxoplasma gondii* irradiado com raios gama é capaz de manter sua morfologia, metabolismo e invasão celular, ou seja, tais funções biológicas não são anuladas por irradiação. O principal efeito da irradiação gama é a perda de capacidade para replicação bacteriana e o acúmulo de fitas-duplas quebradas por radicais livres levando à fragmentação de DNA. Todavia, grande parte do genoma permanece intacta e, conseqüentemente, o microorganismo tem o potencial para expressar genes nestes segmentos e sintetizar proteínas (Trampuz *et al.*, 2006).

Poucos trabalhos envolvendo vacinas contra *Brucella* com formulações inativadas por radiação gama estão disponíveis na literatura (Sanakkayala *et al.*, 2005; Magnani *et al.*, 2009; Moustafa *et al.*, 2011; Dabral *et al.*, 2014). Em seu estudo, Magnani *et al.* (2009) relata que a inativação de *B. melitensis* por irradiação gama impede sua replicação, mas retém todas as características de proteção *in vivo*. As bactérias gama-irradiadas exibiram atividade metabólica e transcricional, persistência em macrófagos, capacidade para estimular linfócitos T citotóxicos específicos contra antígenos (CTLs) e proteger contra um desafio bacteriano virulento sem sinais de virulência residual.

No estudo de Sanakkayala *et al.* (2005) foi demonstrado que a cepa inativada por irradiação gama foi mais eficiente quando comparada à formulação inativada pelo calor, na indução de uma resposta imune do tipo Th1 com detecção predominantemente de IgG2a nos camundongos vacinados, bem como secreção de IFN γ pelos esplenócitos após estimulação *in vitro* com antígenos específicos. Moustafa *et al.* (2006), por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), observaram que as bactérias gama irradiadas persistiram no baço dos camundongos inoculados em maior número e por tempo mais prolongado do que as bactérias inativadas pelo calor.

Uma abordagem alternativa para a indução da imunidade por vacinas inativadas com características desejadas envolve as formulações com adjuvantes. A ampliação do conhecimento na área da imunologia está permitindo a elaboração de vacinas visando à obtenção de uma imunidade específica, protetora e duradoura após a vacinação. A seleção

correta de adjuvantes auxilia para alcançar a resposta imune necessária (Titball, 2008; Sun *et al.*, 2009).

3.6. Adjuvantes

Um adjuvante imunológico atua para acelerar, prolongar ou melhorar a resposta imune do hospedeiro ao antígeno. Alguns adjuvantes, porém, podem gerar reações secundárias e devem ser adaptados de acordo com vários critérios, como a via de imunização, tipo de resposta imune, duração da imunidade ou qualidade do antígeno, a fim de obter o melhor equilíbrio entre eficácia e segurança (Aucouturier *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2017).

Os adjuvantes tornam o antígeno mais visível ou reativo ao sistema imune e diversos mecanismos de ação foram propostos de acordo com o adjuvante utilizado. Anteriormente, a “persistência antigênica” era considerada uma propriedade relacionada unicamente ao efeito de depósito. Hoje esse fenômeno é atribuído à liberação controlada do antígeno e a melhor captação promovida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). A ativação direta de células da imunidade inata (como as APCs) induz a liberação de citocinas e quimiocinas por meio de receptores específicos, influenciando também a resposta imune adaptativa (Garçon *et al.*, 2011).

Os adjuvantes podem ser classificados em diferentes grupos. O primeiro grupo representa os adjuvantes químicos entre os quais estão os imunomoduladores, como o brometo de didodecil dimetilamônio (DDAB) e avridina e os adjuvantes físico-químicos, como emulsões, lipossomas ou microesferas poliméricas. Alguns dos compostos físico-químicos usados para encapsular antígenos também podem ter propriedades imunomoduladoras. Um segundo grupo reúne compostos naturais como o Quil A, glucano ou inulina. Extratos bacterianos, como monofosforil lipídio A (MPLA), trealose dimicolato, CpG ou lipopolissacarídeos e seus derivados, compõem o terceiro grupo. Por fim, um grupo contendo citocinas, como IFN- γ , fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e hormônios também pode ser definido (Aucouturier *et al.*, 2002).

O desenvolvimento dos adjuvantes modernos, que apesar de muitos obstáculos, está em progresso, baseia-se na melhoria e aprimoramento das respostas imunes induzidas por vacinas sem o comprometimento da segurança. Isso é feito por meio de adição seletiva de moléculas bem definidas, formulações ou ambas. Não existe um adjuvante universal e ideal para todas as vacinas. A escolha apropriada do adjuvante a ser combinado ao antígeno é ponto

de extrema importância para a formulação de vacinas eficazes (Garçon *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2013).

3.7. Montanide

Em modelos animais, foram descritos novos adjuvantes que são mais efetivos para intensificar as respostas imunes mediadas por anticorpos e/ou células em comparação ao hidróxido de alumínio (adjuvante universalmente aceito). Em particular, a série Montanide mostrou eficácia superior em uma variedade de vacinas humanas e veterinárias (Jang *et al.*, 2010).

Essas formulações caracterizadas como emulsões de óleo em água, água em óleo, ou água-óleo-água foram desenvolvidas para utilização em vacinas terapêuticas e profiláticas. Para estabilizar essa combinação são adicionados surfactantes que possuem um grupo não polar hidrofóbico e um grupo polar hidrofílico. O componente hidrofílico interage com a fase aquosa da emulsão representada pelo meio antigênico nas vacinas (Aucouturier *et al.*, 2002).

A série de adjuvantes Montanide ISA inclui as emulsões água em óleo, Montanide™ ISA 70 VG (ISA 70) e Montanide™ ISA 71 VG (ISA 71). Essas formulações consistem em soluções baseadas no óleo mineral que incorpora o emulsificante altamente refinado denominado manitol/ácido oleico. O ISA 71 é semelhante ao ISA 70, exceto pela presença de outro óleo mineral aprimorado que permite a estimulação preferencial da imunidade mediada por células do tipo Th1. ISA 70 e ISA 71 já foram utilizados em estudos de vacinas contra patógenos de frangos, bovinos e pequenos ruminantes (Tollersrud *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2010; Zhugunissoff *et al.*, 2018). O Montanide ISA 61 também é um adjuvante dessa série, caracterizado por estimular fortes respostas imunes, tendo sido avaliado em trabalhos envolvendo vacinas contra patógenos de bovinos (Hua *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2015; Khorasani *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2018).

Em relação ao mecanismo de ação é estabelecido que a liberação cinética do antígeno varie conforme o tipo de emulsão. Para uma proteína sem adjuvante a liberação ocorre de forma imediata, contudo, quando é adicionada uma emulsão de óleo em água há discreta redução na velocidade de liberação. Emulsões água em óleo induzem nenhuma ou muito baixa liberação de antígeno. Essas formulações também protegem o antígeno contra uma degradação rápida por enzimas e podem modificar sua carga elétrica tornando-o mais

imunogênico. Além disso, produzem inflamação e estimulam o recrutamento de células apresentadoras de antígenos, macrófagos e linfócitos (Aucouturier *et al.*, 2001).

Outro aspecto importante da resposta imune estimulada por esses adjuvantes é o reconhecimento do antígeno por meio da detecção dos PAMPs, através de PRRs que incluem os TLRs e NODs que são encontrados predominantemente em células do sistema imunológico inato. Com a produção e expressão de IL-2 e sua subunidade alfa dos receptores de IL-2 (CD25) durante a ativação de células Th naive, a proliferação de células Th se inicia. Essas células irão se diferenciar em células Th1 ou Th2 dependendo da citocina presente no ambiente. Diferentes adjuvantes de vacinas que estão em uso na medicina veterinária e humana auxiliam na diferenciação de células Th em várias linhagens de células T, como Th1, Th2, Th9 e Th17. As formulações da série Montanide são capazes de estimular respostas Th1 e Th2 (Taffala *et al.*, 2013).

3.8. Quitosana e alginato

Biomateriais como alginato e quitosana apresentam muitas características desejáveis para um adjuvante entre elas a biocompatibilidade, liberação controlada e sustentada de antígenos, facilidade de administração e ausência de toxicidade. Por meio da técnica de encapsulamento em microesferas, esse novo sistema tem sido cada vez mais explorado na medicina preventiva humana e veterinária, com resultados promissores (Zheng *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2021).

A quitosana é um biopolímero extremamente abundante derivado da quitina natural existente no exoesqueleto de artrópodes, crustáceos e paredes celulares de fungos. Estruturalmente são polissacarídeos com um grupo amina e carga positiva. O alginato é um polissacarídeo de ocorrência natural, extraído da parede celular de algas marrons (Li *et al.*, 2018; Severino *et al.*, 2019).

As formulações da quitosana têm sua estabilidade melhorada a partir da mistura com o alginato de sódio. O alginato tem como características importantes a solubilidade em água (permitindo assim a formação de gel sem aquecimento ou resfriamento) e a capacidade de sua matriz de aprisionar moléculas através de forças capilares, que permanecem livres para migrar por difusão. Essas qualidades tornam os alginatos biopolímeros muito atrativos à encapsulação (Caetano *et al.*, 2016).

Os complexos poliônicos de alginato-quitosana são formados por gelificação iônica através da interação entre o grupo amina (catiônico) da quitosana e o grupo carboxila (aniônico) do alginato. Esse procedimento pode ser realizado sem a adição de nenhum solvente orgânico e na temperatura ambiente. Assim, antígenos podem ser incorporados às matrizes desses biomateriais com retenção de suas atividades biológicas. O íon cálcio é utilizado para fortalecer e estabilizar as partículas (Biswas *et al.*, 2015).

Como adjuvantes vacinais esses sistemas podem oferecer diferentes mecanismos entre eles o direcionamento do antígeno às células apresentadoras (APCs), ativação de células do sistema imune através de citocinas e liberação controlada de proteínas encapsuladas. Em camundongos, a quitosana estimula a resposta Th1 por meio da ativação da via do inflamassoma com as interleucinas 18 e 1 (IL-18 e IL-1) induzindo a maturação de células dendríticas (Sarei *et al.*, 2013; Bueter *et al.*, 2014).

Vários estudos têm associado o uso de micropartículas de alginato a vacinas atenuadas de *Brucella* em camundongos (Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2015a; Costa *et al.*, 2020), em cervos (Arenas-Gamboa *et al.*, 2009b), em pequenos ruminantes (Silva *et al.*, 2015b) e em cães (Eckstein *et al.*, 2020), além de vacinas carreadoras de antígenos contra o vírus da hepatite (Borges *et al.*, 2008) e toxina diftérica (Sarei *et al.*, 2013) em camundongos. Trabalhos envolvendo a utilização da quitosana como adjuvante também têm sido desenvolvidos, entre eles os de vacinas contra *Helicobacter pylori* (Gong *et al.*, 2015), *Neisseria meningitidis* (Baudner *et al.*, 2004) e *Listeria monocytogenes* (Rocha *et al.*, 2021).

Arenas-Gamboa *et al.* (2009a) relataram melhor desempenho da vacina viva atenuada (*Brucella abortus* S19 Δ vjbR) com a utilização de microcápsulas erodíveis de alginato/poli-L-lisina/vpB. Essa formulação demonstrou uma liberação sustentada de antígenos resultando em perfil pronunciado de citocinas Th1 em esplenócitos cultivados, mesmo após oito meses de vacinação.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. Cepas bacterianas e cultivo

As cepas *Brucella ovis* ATCC 25840 e *B. ovis* Δ abcBA previamente descritas por Silva *et al.* (2015) foram utilizadas neste estudo. O cultivo bacteriano foi feito em placas de ágar triptona de soja (TSA) suplementadas com 1% de hemoglobina e incubadas por 72 horas

a 37°C em estufa com 5% de CO₂. A cepa mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi cultivada em meio TSA com 1% de hemoglobina e 100 µg/mL de canamicina. Após o crescimento, as bactérias foram ressuspensas em tampão de salina-fosfato (PBS; pH 7,4) e a concentração de bactérias foi estimada usando um espectrofotômetro (BioRad, Hercules, CA) em densidade óptica de 600 nm (OD₆₀₀). Para uma OD₆₀₀ = 0,250, a concentração estimada de bactéria é 3×10^9 UFC (unidades formadoras de colônias)/mL para a estirpe *B. ovis* ATCC 25840 e 1×10^9 UFC/mL para a estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$. Então, a partir dessa estimativa se efetuou a padronização dos inóculos por meio de diluições. A concentração foi confirmada pelo plaqueamento em placas de TSA com 1% de hemoglobina, sendo a contagem realizada em 72 a 96 horas após o plaqueamento. A manipulação, cultivo e infecções foram feitas em fluxo laminar no laboratório de biossegurança nível 2, no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG.

4.2. Preparo de *Brucella ovis* ATCC 25840 γ -irradiada

Uma suspensão bacteriana na concentração de 1×10^{11} UFC/mL foi irradiada com 15 kilograys (kGy) e acondicionadas a temperatura de -80°C até o momento de utilização. A irradiação foi realizada no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. A suspensão de bactérias irradiadas foi plaqueada em placas TSA com 1% de hemoglobina e incubada a 37°C por 72 horas para confirmação da inativação, não sendo observado o crescimento de colônias.

4.3. Encapsulamento de *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ e *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada

Para *Brucella ovis* $\Delta abcBA$, o encapsulamento foi realizado como previamente descrito por Silva *et al.* (2015) e Arenas-Gamboa *et al.* (2008), em que 1×10^{10} UFC de *B. ovis* $\Delta abcBA$ foi ressuspensa em 2 mL de solução de alginato a 1% (Sigma-Aldrich) e, essa solução foi gotejada com uma agulha de 33G em 10 mL de solução de polimerização (solução de cloreto de cálcio - CaCl₂) a 0,5 mM. Após gotejamento, as microcápsulas formadas foram homogeneizadas por 15 minutos e lavadas duas vezes em solução tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico). Finalizadas as lavagens, foi adicionada solução de poli-L-lisina a 0,05% diluída em solução de alginato a 1%, e homogeneizados durante 5 minutos. Cápsulas contendo as bactérias foram colocadas em solução despolimerizadora (solução contendo citrato de sódio, cloreto de sódio e MOPS), por 10 minutos sob agitação, e em seguida diluídas em PBS e plaqueadas em meio TSA com 1% de hemoglobina. Procedimento

semelhante foi realizado para o encapsulamento da *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada. Contudo, uma concentração de 1×10^{11} UFC/mL foi ressuspensa em 2 mL de alginato. Após a formação de microcápsulas por gotejamento em CaCl_2 , as microcápsulas contendo 1×10^{10} UFC/mL de *B. ovis* γ -irradiada foram homogeneizadas por 30 minutos em solução de quitosana a 1% (pH de 4,5 - 5, dissolvido em ácido acético a 1%) e lavadas uma vez em solução tampão MOPS por 5 minutos. Para o preparo das cápsulas de alginato e quitosana vazias, o procedimento também foi semelhante, sem a incorporação de bactérias a solução de alginato.

4.4. Emulsificação de *Brucella ovis* ATCC 25840 γ -irradiada em Montanide ISA 61

O Montanide ISA 61 VG (Seppic-Brasil) é um adjuvante de água em óleo à base de óleo mineral. No dia da vacinação, a formulação com *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada foi preparada em ISA 61 VG, sendo 400 μL da bactéria na concentração de 1×10^{10} UFC/mL adicionados a 600 μL de Montanide, de acordo com as indicações do fabricante, e emulsionados usando uma seringa de duas vias. O antígeno e ISA 61 VG foram primeiro processados por 20 ciclos de baixa velocidade de emulsificação por aproximadamente 8s/ciclo, seguido por 60 ciclos de emulsificação de alta velocidade por aproximadamente 1s/ciclo. A qualidade da emulsão foi avaliada colocando uma gota na superfície da água. Procedimento semelhante foi realizado para a formulação que seria constituída somente pelo adjuvante, sendo, no entanto, adicionados 400 μL de PBS a 600 μL de Montanide. A preparação da vacina foi considerada bem-sucedida quando a gota flutuou na superfície e manteve seu estado emulsionado água-em-óleo.

4.5. Animais utilizados no experimento

Camundongos C57BL/6 fêmeas de sete semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, foram utilizados neste estudo. Os camundongos foram mantidos em uma sala a 22°C, 12 horas de luz/12 horas de ciclo escuro, com acesso livre a comida e água. Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo CEUA 4/2021).

4.6. Imunização dos camundongos e avaliação do índice de proteção

Trinta camundongos susceptíveis (C57BL/6) à infecção por *Brucella ovis* foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n = 5). Para avaliação dos adjuvantes, o controle positivo utilizado foi o grupo vacinado com a cepa vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato, cujos resultados já são bem conhecidos no modelo murino. Os animais foram imunizados, por via subcutânea, com duas doses de cada formulação (100 μ L cada dose, correspondendo a 10^9 UFC por dose) em um intervalo de 14 dias entre as doses, com exceção da imunização com a vacina viva *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato que foi realizada em dose única correspondendo a 10^8 UFC. Aos 28 dias após o final do protocolo de imunização, os camundongos foram desafiados, por via intraperitoneal, com 1×10^7 UFC de *B. ovis* ATCC 25840. Os protocolos de imunização estão detalhados abaixo para cada grupo:

- i. *B. ovis* $\Delta abcBA$ revestida por cápsulas de alginato (***B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato**)
- ii. *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada revestida por cápsulas de alginato e quitosana (***B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato**)
- iii. *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada associada a Montanide ISA 61 (***B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61**)
- iv. Quitosana e alginato
- v. Montanide ISA 61
- vi. Não imunizados (PBS).

Os camundongos foram observados diariamente durante todo o experimento, após a primeira imunização, para monitorar o sítio de inoculação e eventuais sinais clínicos. A espessura da pele foi mensurada com o auxílio de um paquímetro e o peso dos animais também foi avaliado. As lesões foram classificadas conforme escore abaixo:

Tabela 2: Escore de lesões no sítio de aplicação das formulações vacinais.

Score	Grau	Edema	Eritema, alopecia e fistulações
1	Ausente	Espessura da pele: 1,0 a 1,5 mm	Ausentes
2	Leve	Espessura da pele: 2,0 a 3,5 mm	Ausentes
3	Moderado	Espessura da pele: 4,0 a 6,5mm	Eritema e alopecia presentes, sem fistulações.
4	Intenso	Espessura da pele: 7,0 a 9,5 mm	Eritema, alopecia e fistulações.

Duas semanas após o desafio os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina a 2% (0,1 mg/Kg) e cloridrato de cetamina 1% (35 mg/Kg) e eutanasiados por deslocamento cervical. Após a eutanásia, o fígado e baço foram coletados e pesados, homogeneizados com PBS e submetidos à homogeneização e diluição para contagem de UFC em meio TSA com 1% de hemoglobina. Amostras de fígado e baço foram também submetidas à histopatologia.

A avaliação de proteção conferida pelas formulações vacinais foi avaliada com base na redução da carga bacteriana em UFC de *Brucella* no baço dos camundongos após desafio com a estirpe virulenta de *B. ovis* ATCC 25840. A medida utilizada conhecida como “índice de proteção” representa a subtração da UFC no baço entre os camundongos não imunizados e os imunizados.

4.7. Histopatologia e imuno-histoquímica

Fragmentos de fígado, baço e sítio de aplicação da vacina foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após a fixação os fragmentos foram desidratados em uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90% e absoluto) e então submetidos à diafanização por xilol. Após diafanização os fragmentos foram embebidos e incluídos em parafina. Os fragmentos foram seccionados com espessuras de 3 a 4 µm e corados com hematoxilina e eosina. As lesões observadas no fígado e baço foram classificadas por escores de necrose e inflamação, com os valores de inflamação variando de **0** a **3**, sendo **0 - ausente**, **1 - discreto**, **2 - moderado** e **3 - acentuado**. O escore de necrose variou de **0** a **1**, sendo **0 - ausente** ou **1 - presente**. Os escores de necrose e inflamação foram somados totalizando um escore que variou de **0** a **4**. Foi também realizada imuno-histoquímica para detecção *in situ* de antígenos de *Brucella* sp. Os cortes histológicos em lâminas foram desparafinizados pela imersão em xilol por 2 vezes durante 15 minutos, reidratados em banhos de 5 minutos em etanol com diluições decrescentes (100, 100, 90, 80 e 70%) e realizadas 3 lavagens com PBS por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução bloqueadora de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e metanol a 3% e realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó (Molico, Nestlé®) 6%, por 40 minutos cada passo. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas por 1 hora com anticorpo primário policlonal anti-*Brucella* spp., produzido em coelho na diluição de 1:1000. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em PBS e incubados com anticorpo secundário EnVision™ FLEX+ system – Dako por 30 minutos, seguida de nova lavagem com PBS e imunomarcação com cromógeno 3’3- diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen system; Dako North

America, Via Real Carpinteria, CA, USA) (DAB) por 45 segundos. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer por 60 segundos. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

4.8. Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imunológica humoral induzida em camundongos após a vacinação foi avaliada por meio de ELISA, mensurando títulos específicos de IgM, IgG total e suas subclasses, IgG1, IgG2b e IgG3. Para isso foram utilizadas placas de ELISA (Costar, Sigma-Aldrich, EUA) previamente sensibilizadas com 100 µL de antígeno bruto sonicado de *Brucella 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 solução fosfato salina com Tween (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, foi removida a solução dos poços. As amostras de soros dos animais 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, IgG2b e IgG3) conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 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 foram adicionados 100 µL/poço do substrato (0,1 M de ácido cítrico anidro, 0,2 M de fosfato de sódio, 0,05% de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,1% de peróxido de hidrogênio). As placas foram protegidas da luminosidade por 5 minutos com a solução reveladora, sendo a reação interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A absorbância foi analisada em leitor de ELISA a 492 nm (MR-96A Microplate reader, Mindray, China). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.9. Análise estatística

Os dados obtidos na contagem de UFC foram normalizados por transformação logarítmica, e submetidos à análise pelo teste t student. A avaliação da espessura e do escore das lesões macroscópicas da pele, assim como o escore histopatológico de lesões do fígado e baço foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a mensuração do título de anticorpos e ganho de peso dos animais, os dados passaram por teste de normalidade e foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Em seguida suas

médias foram comparadas através do teste de Tukey. 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. As formulações vacinais *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato e *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 incitam reação inflamatória duradoura no local da inoculação, e o Montanide ISA 61 não provoca úlceras e fistulações.

Estudos anteriores do grupo (Rocha, 2020; Oliveira, 2021) relataram intensa inflamação no local de inoculação em razão da associação dos biopolímeros quitosana e alginato ao antígeno. Visando atenuar esse efeito, para as formulações inoculadas em duas doses, as aplicações foram realizadas em locais distintos conforme mostra a **Tabela 3**.

Tabela 3. Locais de inoculação, via de administração, concentração do antígeno e volume das formulações vacinais associadas aos adjuvantes utilizados no estudo.

Adjuvante	Concentração do antígeno	Volume	Via de administração/ local
Alginato e quitosana	1×10^{10} UFC/mL ou ausente	100 μ L	Subcutânea (Região cervical e lombar)
Montanide ISA 61	1×10^{10} UFC/mL ou ausente	100 μ L	Subcutânea (Região cervical e lombar)

Para a formulação *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato a inoculação foi feita apenas na região cervical, uma vez que essa era realizada em dose única. Ainda assim, os animais pertencentes a esse grupo, bem como os animais pertencentes ao grupo *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato mostraram significativo desconforto durante a mensuração da espessura da pele no local de aplicação; comportamento não observado nos grupos imunizados com Montanide ISA 61 associado a *B. ovis* γ -irradiada e nos grupos que receberam somente os adjuvantes (Quitosana-alginato e Montanide ISA 61). Os animais imunizados com *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato e *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato apresentaram aumento de volume progressivo e

duradouro nos locais da aplicação. Para o grupo *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, o aumento de volume no sítio de inoculação foi observado somente em pontos mais tardios do experimento (**Figura 1**). Cabe ressaltar que para 2 camundongos do grupo *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato e 3 camundongos do grupo *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato foi observada presença de fistulas drenando exsudato purulento associada a áreas ulceração (**Figura 2 e Figuras 3 A, B, C, F e G**); lesões não observadas nos grupos imunizados com *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 (**Figura 2 e Figuras 3D e 3H**) e nos demais grupos que receberam somente os adjuvantes. Os animais não imunizados não mostraram qualquer alteração de espessura da pele durante todo o experimento (**Figura 1**). Os resultados de média da espessura da pele foram analisados quanto à normalidade antes de serem submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com os valores das médias comparadas pelo teste de Dunn's. Foi evidenciado que os grupos *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato e *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato apresentaram valores maiores que o grupo *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e que os grupos que receberam apenas quitosana-alginato, Montanide ISA 61 e que o grupo não imunizado ($p < 0,001$). Para o escore de lesão os resultados de mediana foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com os valores comparados pelo teste de Dunn's. Os resultados indicaram diferença significativa com valores mais altos para os grupos *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato e *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato em comparação aos demais.

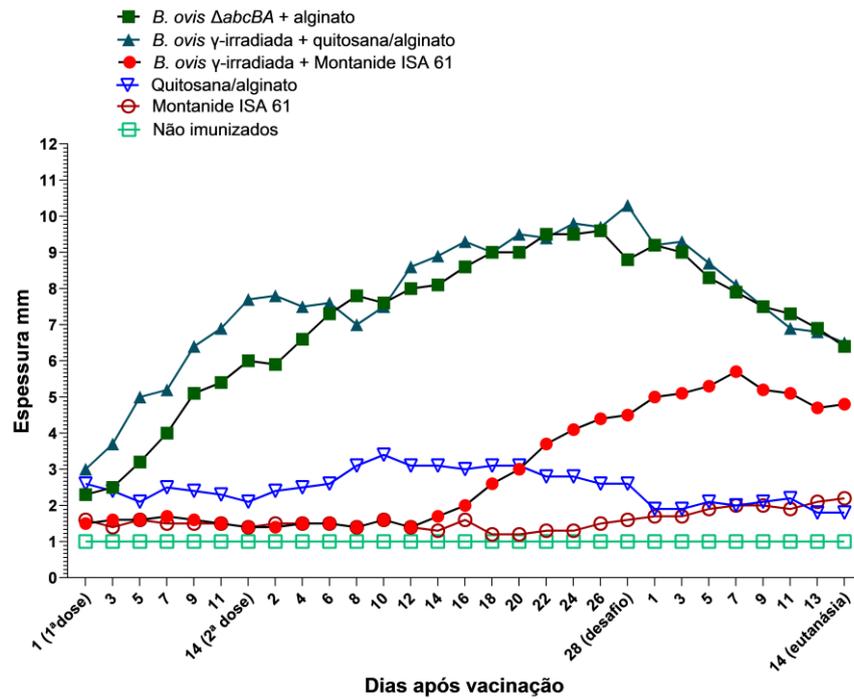


Figura 1. Espessura da pele no sítio de inoculação das formulações em camundongos C57BL/6 avaliada por 56 dias. Camundongos foram imunizados por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, quitosana e alginato, Montanide ISA 61 e PBS (não imunizados). Os dados representam a média da espessura da pele por grupo, no sítio de aplicação.

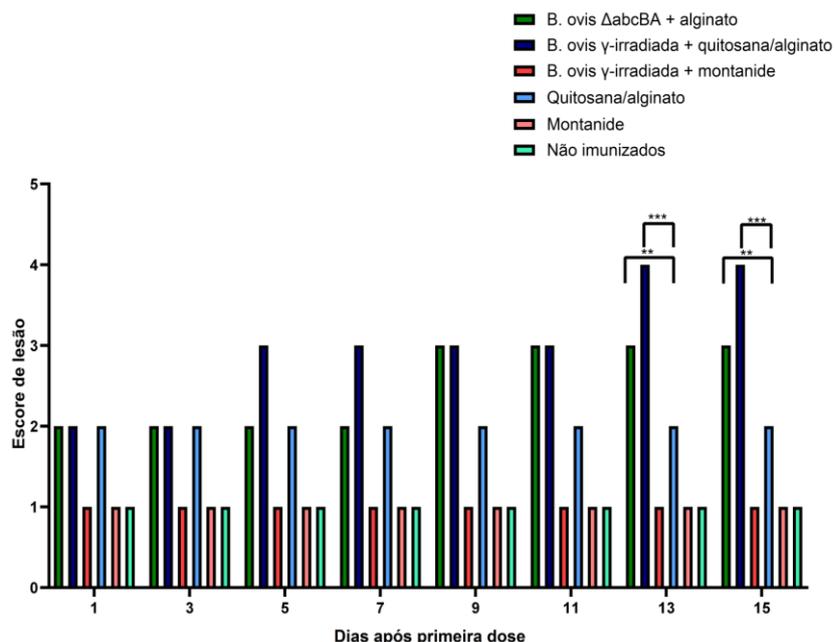


Figura 2. Escore de lesão no sítio de aplicação de camundongos após inoculação da primeira dose. Camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5), inoculados por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, quitosana e alginato, Montanide ISA 61 e PBS (não imunizados). Os dados representam a mediana de cada grupo. Os resultados foram analisados por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (** p < 0,01; *** p < 0,001).

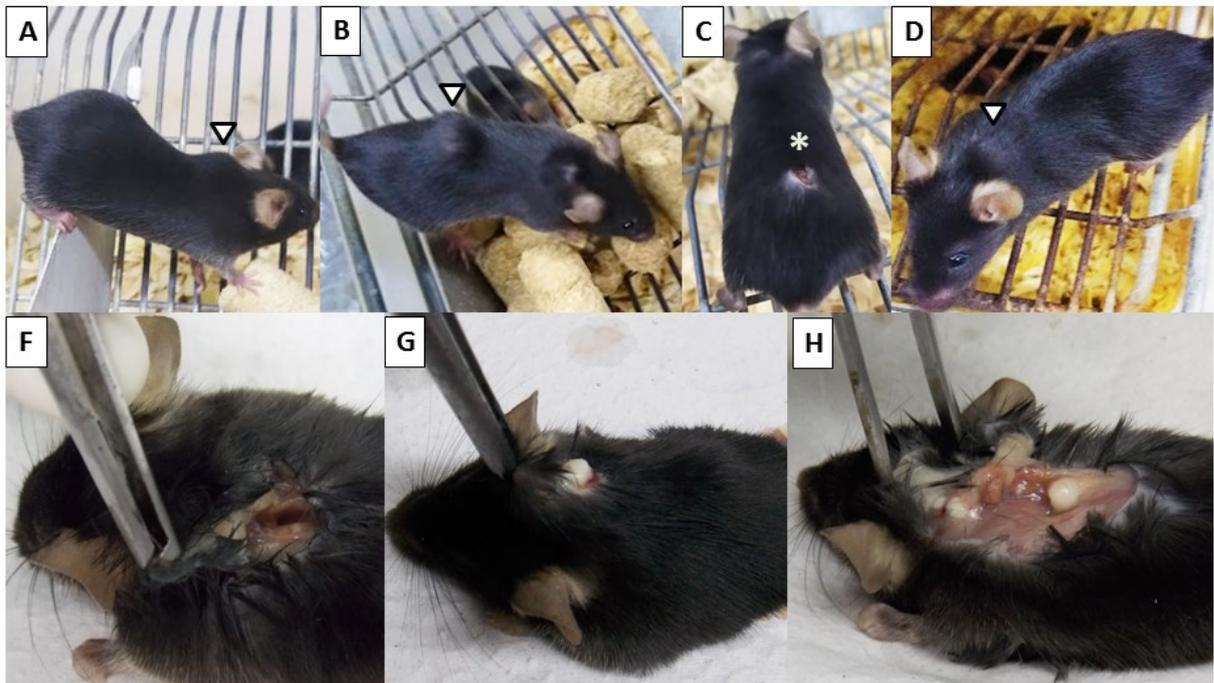


Figura 3. Reações locais relacionadas à inoculação de *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato e *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 em camundongos C57BL/6. (A e F) aumento de volume na região cervical associado à presença de fístula em camundongo inoculado com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato. (B, C e G) aumento de volume na região lombar, úlcera na região lombar e fístula drenando exsudato purulento na região cervical em camundongo vacinado com *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato. (D e H) mostram aumento de volume na região cervical associado a material branco, de superfície lisa e bem delimitado no subcutâneo de camundongo vacinado com *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61.

Na histologia (**Figuras 4A, B e C**) foi observado intenso infiltrado inflamatório circundado por abundante deposição de fibras de colágeno associado à fibrina, edema e restos necróticos. Esse infiltrado era composto por numerosos macrófagos epitelioides, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos. Multifocalmente havia quantidades moderadas de material granular anfófilico ou espaços brancos e bem delimitados (interpretados como restos dos adjuvantes). O infiltrado se estendia em derme profunda, subcutâneo e musculatura, na qual, por vezes, havia fibras musculares com perda de estriações e hipereosinofilia. As alterações foram compatíveis com reação local à formulação, sobretudo, nos grupos em que a bactéria estava associada (tanto na estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ como na inativada *B. ovis* ATCC 25840 γ -irradiada), uma vez que para os grupos inoculados apenas com os adjuvantes quitosana-alginato e Montanide ISA 61 (**Figuras 4D e E**) a reação foi menos acentuada. No grupo não imunizado (PBS), não foi observada nenhuma alteração histológica significativa no local de inoculação (**Figura F**).

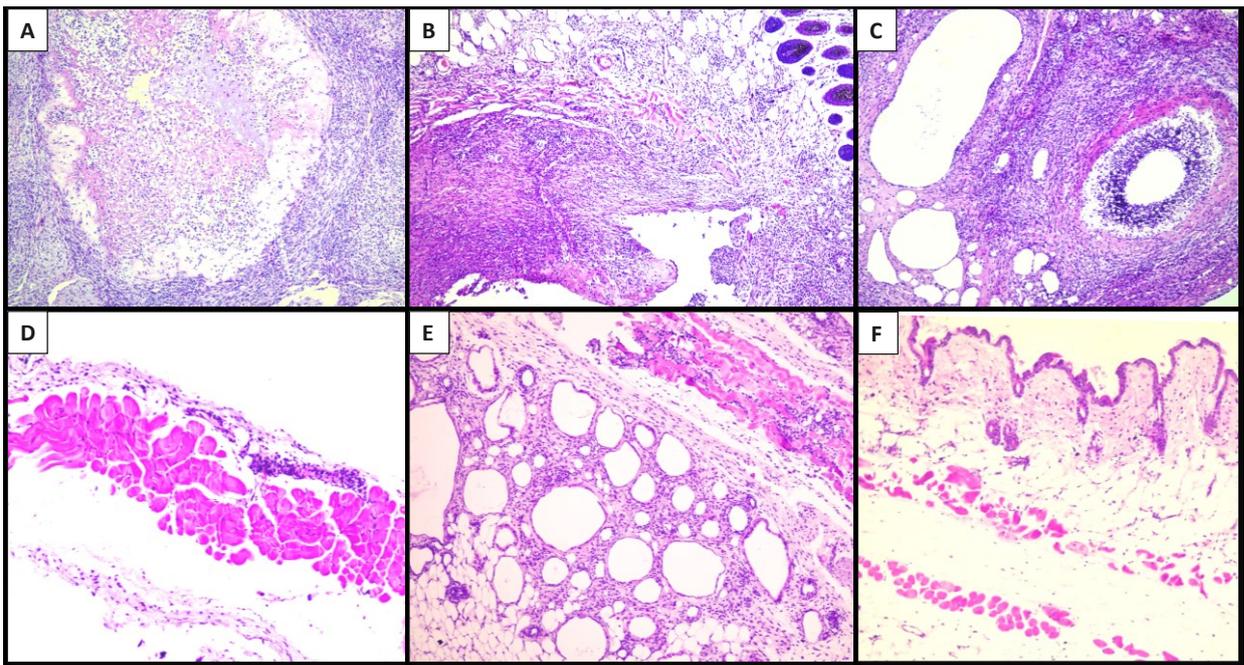


Figura 4. Lesões no sítio de inoculação de formulações vacinais em camundongos C57BL/6. (A) Camundongos C57BL/6 fêmeas inoculados por via subcutânea com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, (B) *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, (C) *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, (D) quitosana e alginato, (E) Montanide ISA 61 e (F) não imunizados.

No que se refere à mensuração do peso dos animais, nenhum animal perdeu peso e não houve diferença ao se considerar o ganho ao longo de todo o experimento entre os diferentes grupos.

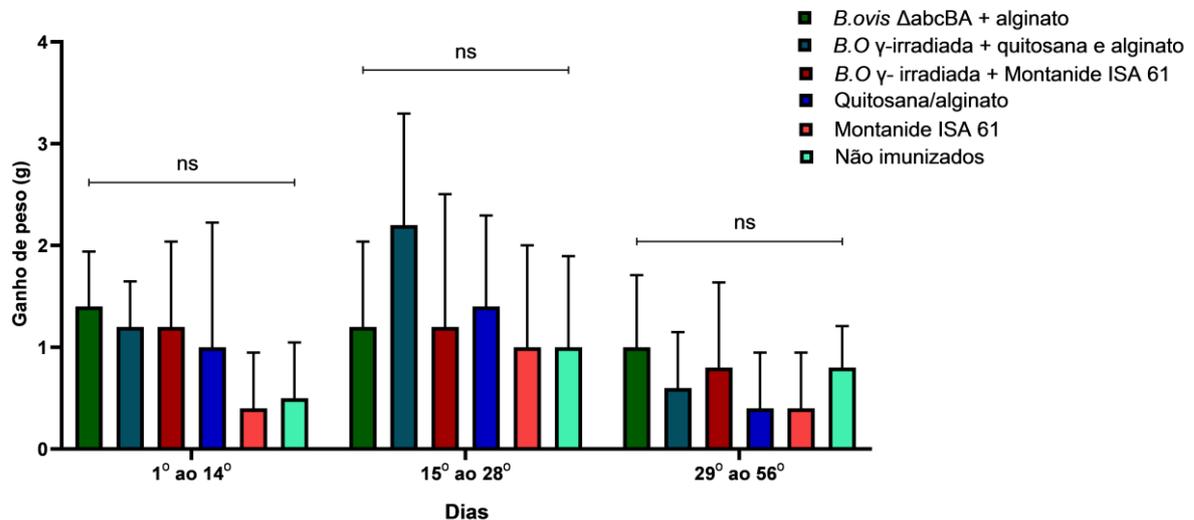


Figura 5. Ganho de peso dos camundongos C57BL/6 fêmeas avaliado por 56 dias. Não foi observada diferença estatística entre os diferentes grupos. Os resultados foram analisados quanto a normalidade antes de serem submetidos a ANOVA, com os valores das médias comparadas pelo teste de Tukey. Ns $p > 0,05$.

5.2. A imunização com *Brucella ovis* γ-irradiada revestida por cápsulas de alginato e quitosana e *B. ovis* γ-irradiada associada a Montanide ISA 61 induzem uma forte resposta imune humoral em camundongos desafiados com estirpe selvagem de *B. ovis*.

Para avaliar a resposta imune humoral, títulos de anticorpos foram mensurados no soro dos camundongos que receberam as formulações e foram posteriormente desafiados com a estirpe selvagem. O soro desses animais foi coletado durante a realização da necropsia após punção cardíaca.

Os resultados de IgG total (**Figura 6**) evidenciaram que as formulações vacinais associadas à bactéria *B. ovis* γ-irradiada, bem como à estirpe mutante *B. ovis* ΔabcBA exibiram elevados títulos de anticorpos com diferença estatística significativa em relação aos animais não imunizados e aos animais que receberam somente os adjuvantes.

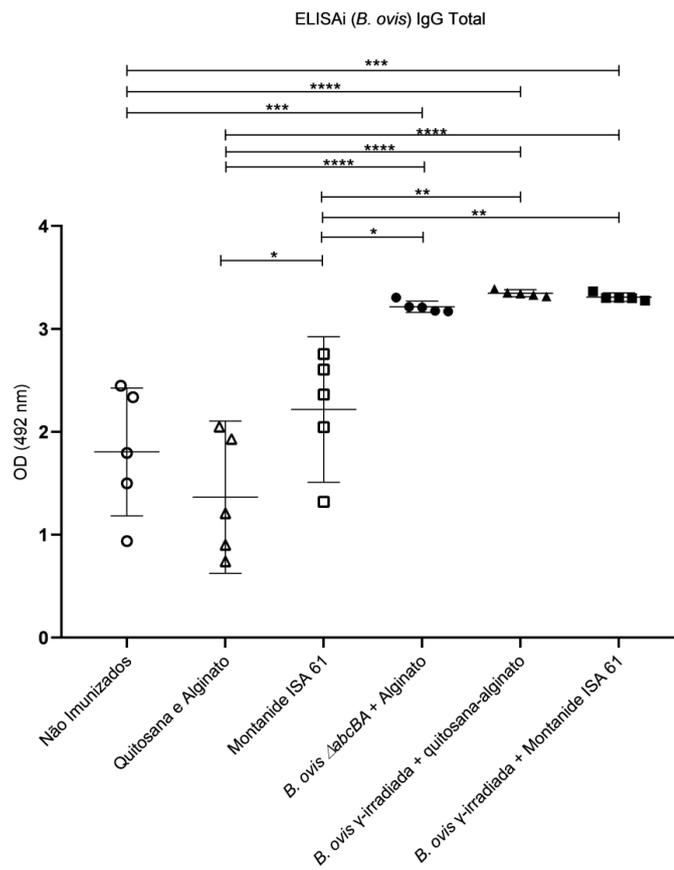
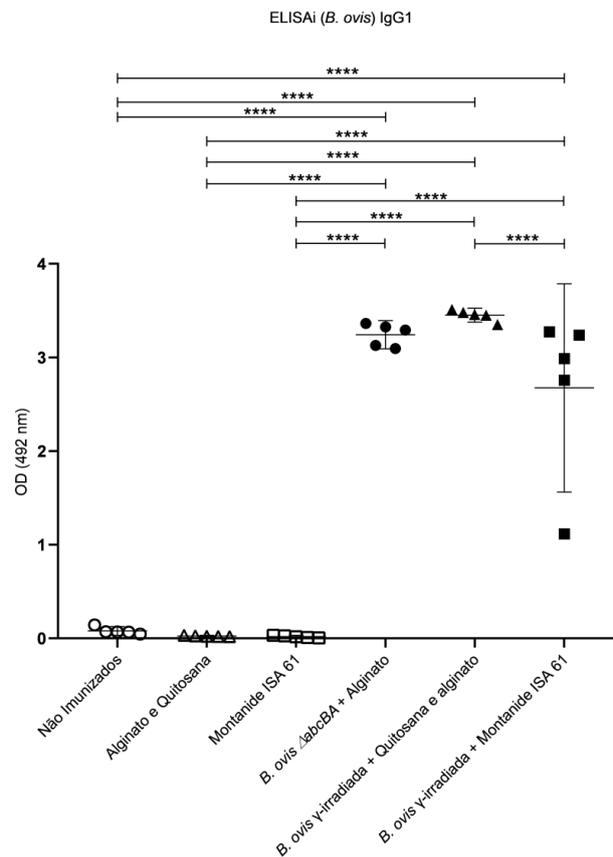


Figura 6. IgG em camundongos C57BL/6. Foram determinados os títulos totais de IgG por meio de ELISAI no soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5) que haviam sido inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) de 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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Em relação às subclasses de imunoglobulinas, foram mensurados os títulos de IgG1, IgG2b e IgG3, com o objetivo de avaliar se as formulações foram capazes de induzir uma resposta de perfil predominantemente Th1, sendo essa importante no controle da infecção por *Brucella*. Para os títulos de IgG1 (**Figura 7A**), os resultados mostraram que as formulações vacinais associadas à bactéria *B. ovis* γ -irradiada, bem como à estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$

exibiram elevadas concentrações de anticorpos com diferença estatística significativa em relação aos animais não imunizados e aos animais que receberam somente os adjuvantes. Contudo, houve também diferença estatística significativa entre os títulos induzidos pela formulação *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato quando comparada a *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, em que a última induziu concentrações mais baixas dessa subclasse. No que se refere à subclasse IgG2, optou-se por mensurar IgG2b (**Figura 7B**) como um dos indicadores de resposta Th1, por se tratar de camundongos C57BL/6 (Martin *et al.*, 1998; Fornefett *et al.*, 2018). Os resultados também evidenciaram que as formulações vacinais associadas à bactéria *B. ovis* γ -irradiada, bem como à estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ exibiram elevados títulos de anticorpos com diferença estatística significativa em relação aos animais não imunizados e aos animais que receberam somente os adjuvantes. O mesmo foi observado, ainda que em magnitude menor, para a subclasse IgG3 (**Figura 7C**), também relacionada a um perfil de resposta Th1. Ao se avaliar a razão IgG2b/IgG1, as formulações *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato e *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato obtiveram como valores 0,84 e 0,86, respectivamente ($IgG2b/IgG1 < 1$). Por sua vez, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 apresentou razão igual a 1,09, indicando assim, um perfil de resposta predominantemente Th1 ($IgG2b/IgG1 > 1$).

A.



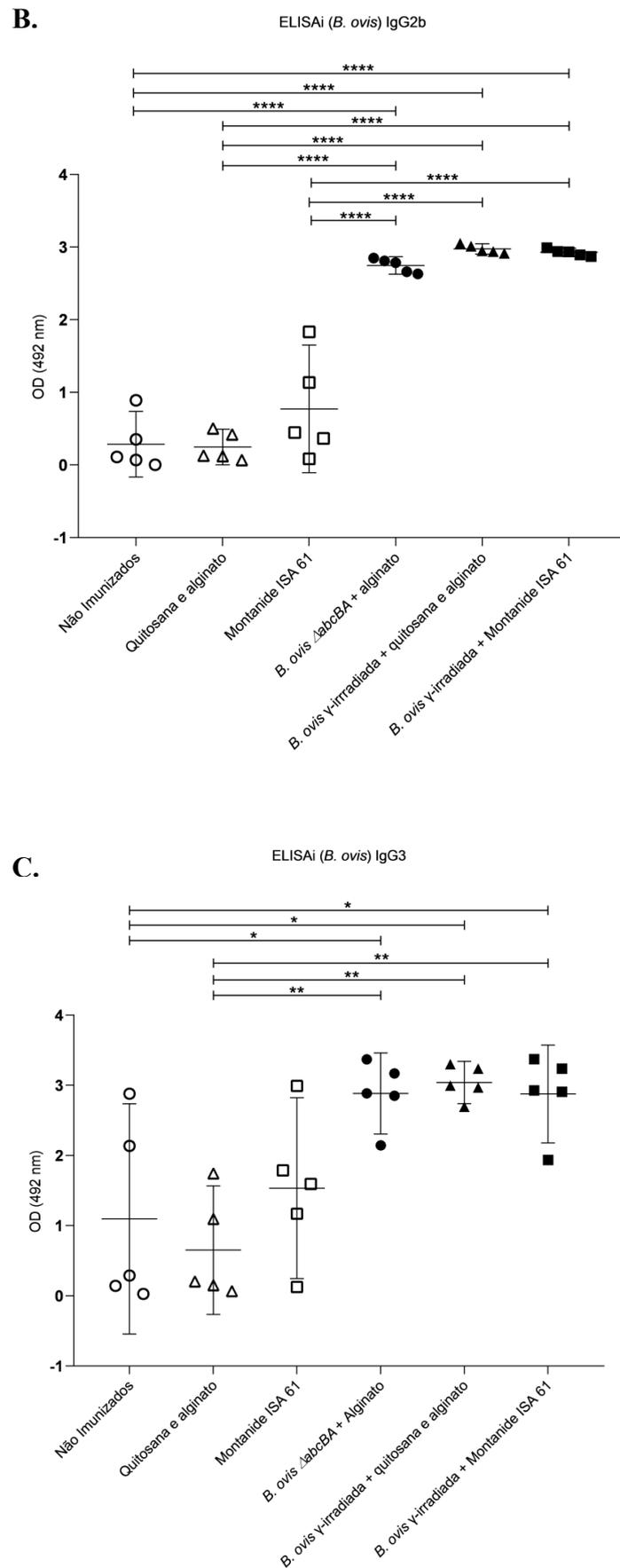


Figura 7. Títulos de IgG1, IgG2b e IgG3 em camundongos C57BL/6. Os títulos de (A) IgG1, (B) IgG2b e (C) IgG3 foram mensurados por meio de ELISAI no soro de camundongos

C57BL/6 fêmeas (n = 5) que haviam sido inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) de 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 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Para os títulos totais de IgM (**Figura 8**) foi observada diferença estatística com valores mais elevados para os grupos vacinados em comparação aos grupos que receberam somente os adjuvantes e o grupo não imunizado (PBS). Todavia, cabe ressaltar que os valores de IgM nesse caso, em razão do tempo, estão relacionados à resposta imune frente ao desafio com a estirpe virulenta, sendo, portanto, pouco específica em termos de resposta vacinal.

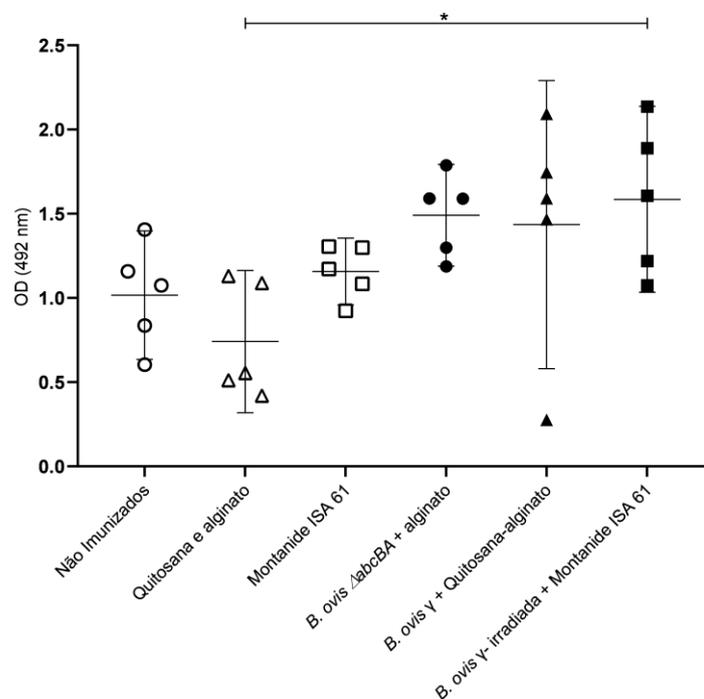


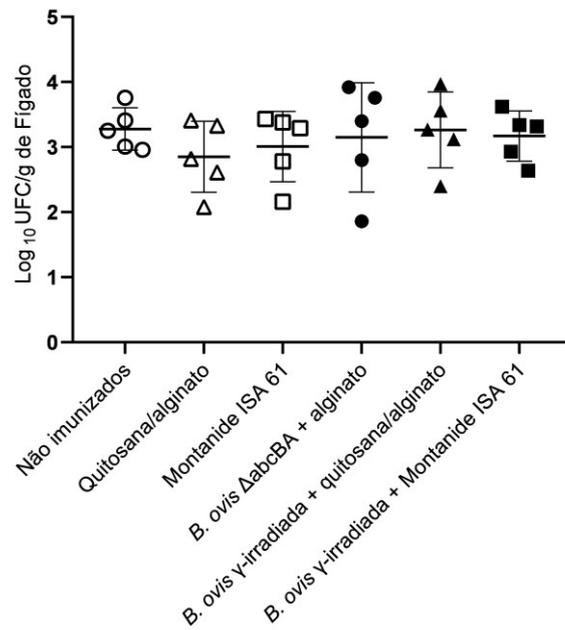
Figura 8. Títulos totais de IgM em camundongos C57BL/6. Foram determinados os títulos totais de IgM por meio de ELISAi no soro de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5) que haviam sido inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato,

Montanide ISA 61, *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) da 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 (* $p < 0,05$).

5.3. A vacinação com *Brucella ovis* γ -irradiada revestida por cápsulas de alginato e quitosana ou associada a Montanide ISA 61 não conferiu proteção contra o desafio com estirpe virulenta de *B. ovis*.

Estudos anteriores demonstraram o potencial vacinal da cepa *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato, reduzindo as lesões e a carga bacteriana em camundongos desafiados com a cepa virulenta de referência *B. ovis* ATCC 25840 (Silva *et al.*, 2015a) e contra cepas de campo (Carvalho *et al.*, 2020). Assim, ela foi selecionada como o controle positivo para o experimento. Os resultados mostraram que para o grupo que recebeu a estirpe mutante encapsulada em alginato, houve redução com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na carga bacteriana no baço em comparação aos animais não imunizados, que receberam somente PBS (**Figura 9B**). Todavia, para as formulações vacinais em que a bactéria *B. ovis* ATCC 25840 foi inativada por raios gama associada à quitosana-alginato ou Montanide ISA 61, não foi observada diferença. Ao se avaliar a recuperação bacteriana no fígado (**Figura 9A**), nenhum dos grupos vacinados apresentou redução significativa de UFC, comparando-se ao grupo não imunizado (PBS). O índice de proteção para cada formulação está detalhado na **Tabela 4**. Os dados indicam que para a estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato há uma redução significativa de 0,50 Log referente à recuperação bacteriana no baço quando comparado ao grupo não imunizado. Para os demais grupos, não foi observada diferença estatística significativa.

A.



B.

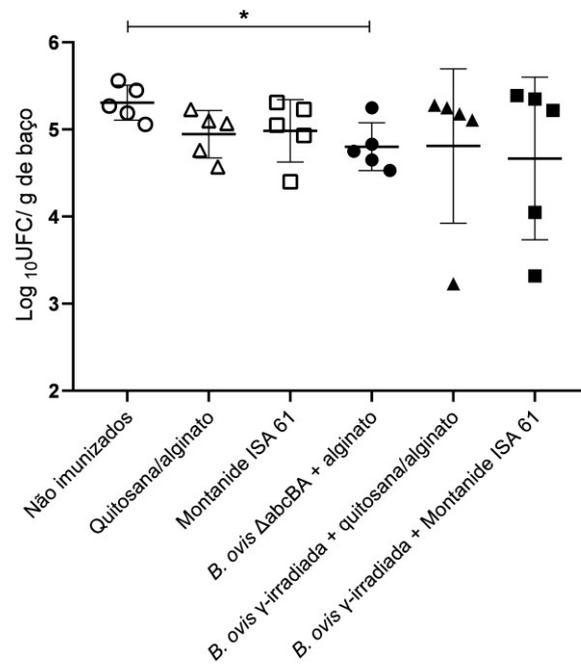


Figura 9. Recuperação bacteriana de amostras de (A) fígado e (B) baço de camundongos C57BL/6. Camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 5), foram inoculados por via subcutânea com PBS (não imunizados), quitosana e alginato, Montanide ISA 61, *Brucella ovis* ΔabcBA + alginato, *B. ovis* γ-irradiada + quitosana-alginato ou *B. ovis* γ-irradiada + Montanide ISA 61 e posteriormente desafiados com a estirpe selvagem de *B. ovis*. Os dados são expressos como valores individuais (pontos) das médias com desvio padrão. Os resultados passaram por

transformação logarítmica antes de serem submetidos ao teste t-student. As diferenças estatísticas estão representadas por asteriscos (* $p < 0,05$).

Tabela 4. Proteção induzida pelas formulações *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, quitosana-alginato e Montanide ISA 61 em camundongos C57BL/6 experimentalmente desafiados com *B. ovis*. Diferenças estatisticamente significativa (*, $p < 0,05$) entre o grupo vacinado e o não imunizado (PBS).

Grupos	Log ₁₀ UFC/g do baço dos animais vacinados	Log ₁₀ UFC/g do baço dos animais não vacinados	Índice de proteção
<i>B. ovis</i> $\Delta abcBa$ + alginato	4,80 ± 0,28	5,30 ± 0,21	0,50*
<i>B. ovis</i> γ -irradiada + Quitosana-	4,81 ± 0,88	5,30 ± 0,21	0,49
<i>B. ovis</i> γ -irradiada + Montanide ISA	4,67 ± 0,94	5,30 ± 0,21	0,63
Quitosana + Alginato	4,95 ± 0,27	5,30 ± 0,21	0,35
Montanide ISA 61	4,99 ± 0,36	5,30 ± 0,21	0,31

Na histopatologia, todos os grupos apresentaram agregados multifocais e aleatórios de células inflamatórias, compostos por macrófagos epitelioides, linfócitos e neutrófilos associados à necrose, compatíveis com microgranulomas no fígado (**Figuras 10A a 10F**). No baço, foi observado o mesmo tipo de infiltrado inflamatório também com distribuição multifocal (**Figura 11A a 11F**). Embora o grupo *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 tenha apresentado valores menores de mediana no escore de baço e fígado, não houve diferenças significativas entre os diferentes grupos (**Figura 10G e 11G**).

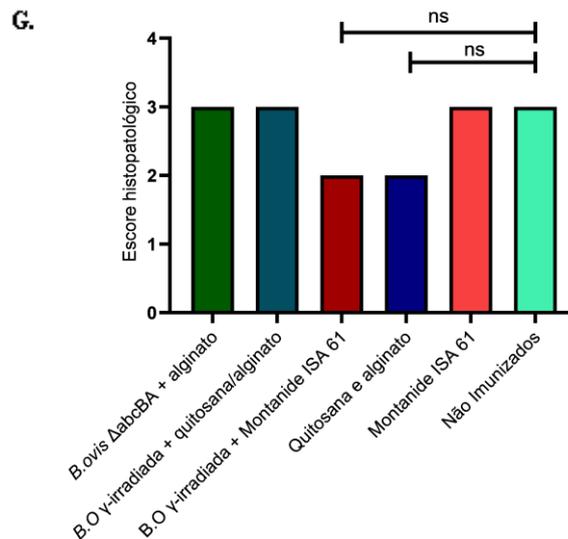
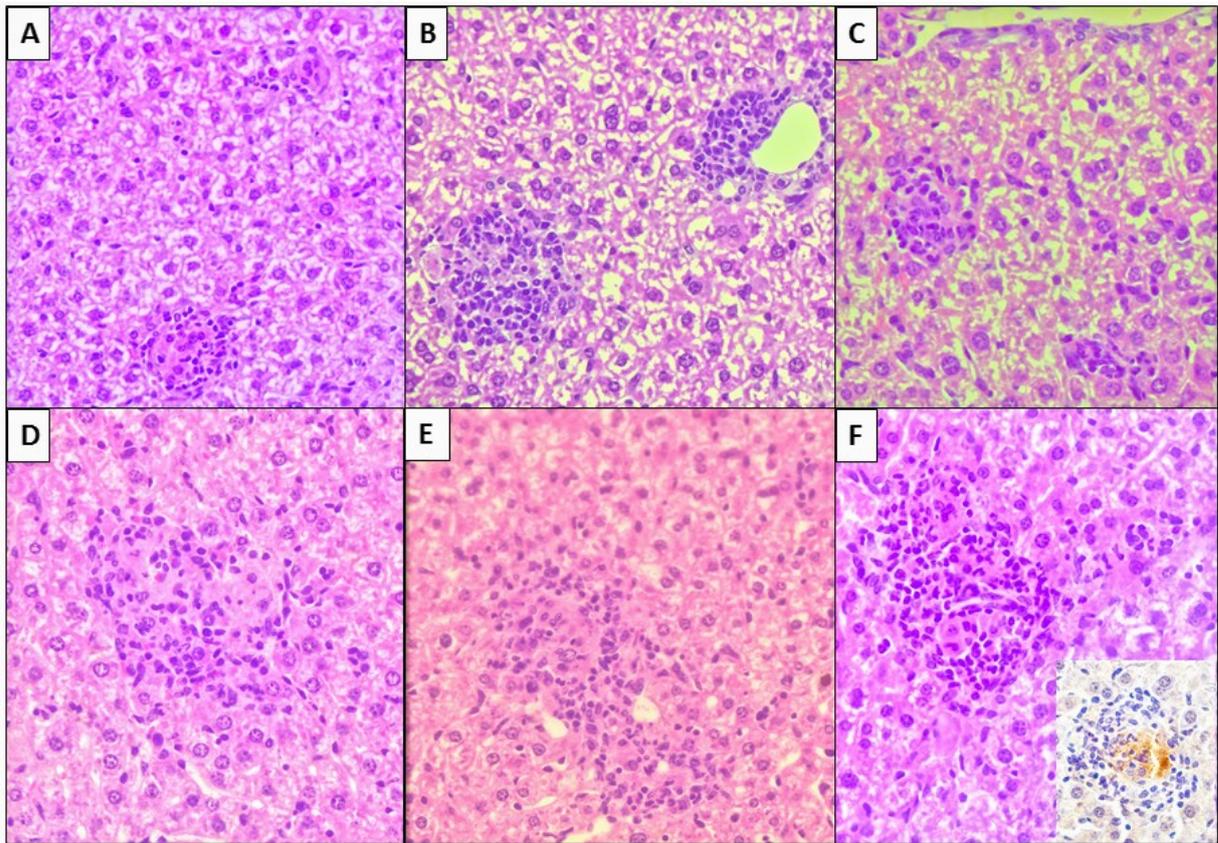


Figura 10. Fígados de camundongos C57BL/6 inoculados por via subcutânea com (A) *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, (B) *B. ovis* γ -irradiada encapsulada em quitosana-alginato, (C) *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, (D) quitosana e alginato, (E) Montanide ISA 61 e (F) não imunizados (PBS), posteriormente desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Nas

micrografias se observam microgranulomas em todos os grupos, com agregados maiores de células inflamatórias no grupo não imunizado e nos grupos que receberam apenas os adjuvantes. H.E 40x. Na figura **F** se observa também, em detalhe, marcação imunohistoquímica de *Brucella*. Pelo escore histopatológico (**G**) não houve diferença significativa entre os grupos. As medianas de cada grupo foram analisadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Ns $p>0,05$.

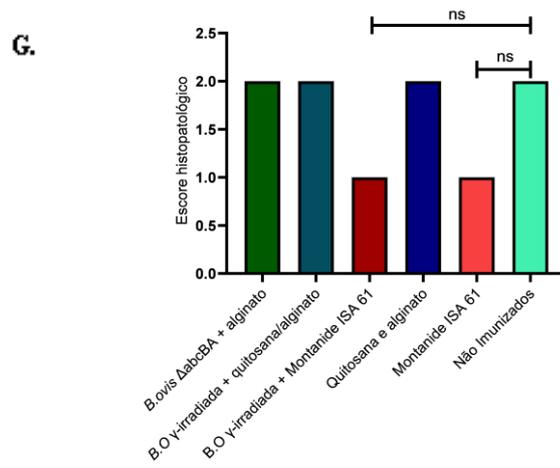
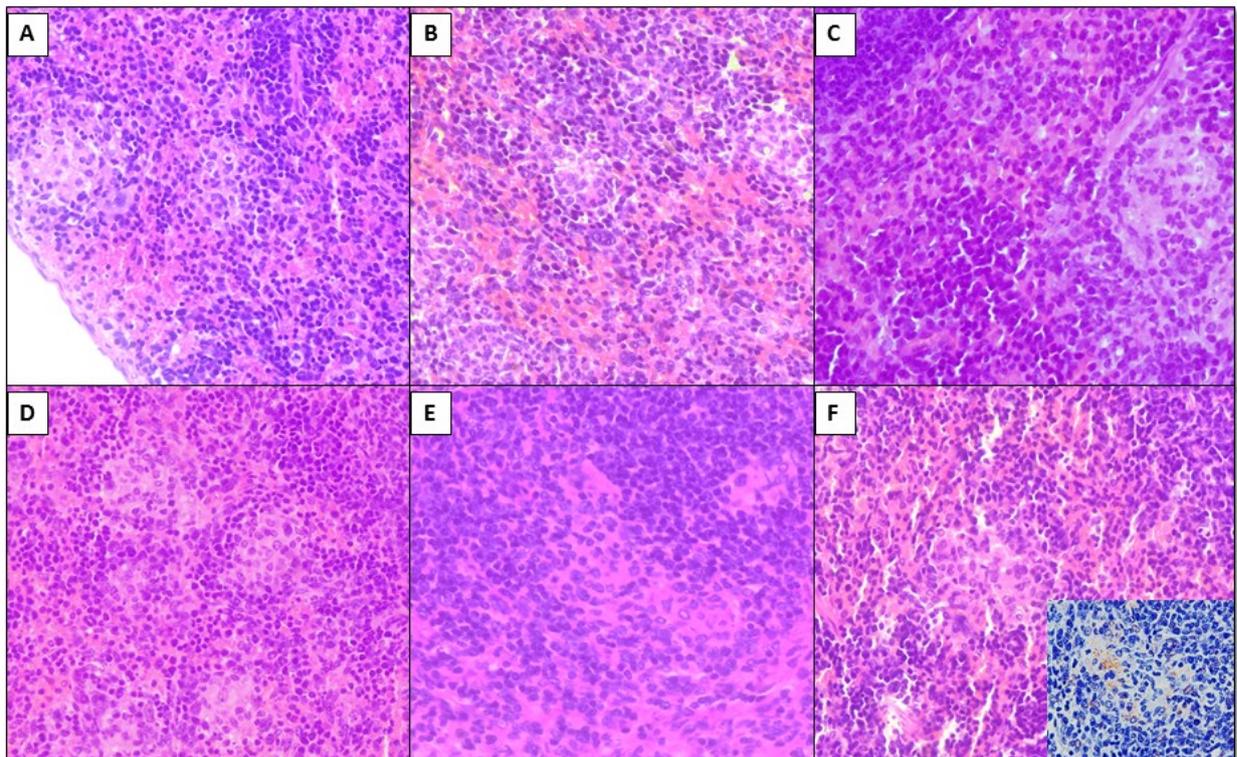


Figura 11. Baço de camundongos C57BL/6 inoculados por via subcutânea com (A) *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ + alginato, (B) *B. ovis* γ -irradiada + quitosana-alginato, (C) *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61, (D) quitosana e alginato, (E) Montanide ISA 61 e (F) não imunizados (PBS), desafiados com a estirpe virulenta de *B. ovis*. Nas micrografias se observam microgranulomas em todos os grupos, com agregados maiores de células inflamatórias no grupo não imunizado e nos grupos que receberam apenas os adjuvantes. H.E 40x. Na figura F se observa também, em detalhe, marcação imuno-histoquímica de *Brucella*. Pelo escore histopatológico (G) não houve diferença significativa entre os grupos. As medianas de cada grupo foram analisadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Ns $p > 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas vacinas visa associar respostas imunológicas protetoras e bem direcionadas ao imunógeno de interesse, evitando também efeitos colaterais prejudiciais que possam ser causados por adjuvantes. Embora a eficácia seja um resultado essencial para uma formulação vacinal, biocompatibilidade é considerado critério crítico nesse processo. Reações adversas no local de inoculação que causem dor ou dano tecidual são os principais obstáculos no desenvolvimento e licenciamento de vacinas contendo adjuvantes imunoestimuladores (Huntimer *et al.*, 2013).

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que ao se associar a estirpe vacinal mutante atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$ a microesferas de alginato (Silva *et al.*, 2015a) ou quitosana-alginato (Oliveira, 2021) se obtinha uma vacina eficaz tanto no modelo murino quanto no hospedeiro natural (Silva *et al.*, 2015b). De fato, o índice de proteção obtido no presente estudo pela formulação *B. ovis* $\Delta abcBA$ + alginato corrobora com os resultados dos trabalhos anteriormente citados. Alguns autores (Rocha 2020; Oliveira, 2021), no entanto, relataram intensa reatogenicidade local com formação de úlceras e fístulas no subcutâneo de alguns camundongos submetidos à imunização com esses adjuvantes, sobretudo, quando associados ao antígeno, resultado também evidenciado neste trabalho.

Pelo exposto, a busca de novos adjuvantes mais seguros, eficazes e de baixa toxicidade é necessária. O Montanide ISA 61VG é uma nova formulação à base de óleo mineral pronto para uso em ruminantes que oferece o potencial de induzir respostas imunes intensas e de longa duração. Os resultados do presente estudo demonstram pelo escore de lesão que o Montanide ISA 61 é mais adequado, em termos de reatogenicidade, quando

comparado ao alginato ou ao complexo quitosana-alginato e corroboram com Petermann *et al.* (2017) que observaram somente o aumento da espessura da pele como efeito adverso à vacinação com esse adjuvante em bovinos. Apesar de baixa reatogenicidade, o Montanide ISA 61 promoveu uma resposta inflamatória local intensa e duradoura conforme demonstrado pelos achados histopatológicos (Figura 4C).

A indução do tipo apropriado de resposta imune é essencial para o desenvolvimento de proteção. Em camundongos, as respostas polarizadas do tipo 1 ou 2 estão associadas à expressão de citocinas específicas, como o IFN γ relacionado à produção de IgG2a, IgG2b e IgG3 (resposta Th1), e à IL-4 associada à produção de IgG1 (resposta Th2). O perfil Th1 relacionado à síntese de IFN γ desempenha importante papel para a imunidade protetora contra *Brucella* (Estes e Brown, 2002; Velikovskiy *et al.*, 2003). Nesse estudo, a associação de *B. ovis* inativada por raios gama ao adjuvante Montanide ISA 61, bem como ao complexo quitosana-alginato foi capaz de induzir elevados níveis de IgG1, IgG3 e IgG2b sendo o último importante marcador de resposta Th1 em camundongos C57BL/6 (Fornefett *et al.*, 2018). Os níveis de imunoglobulinas observados tiveram diferença significativa em relação aos grupos que receberam somente os adjuvantes e aos animais não imunizados. Por sua vez, foram semelhantes aos valores obtidos pelos grupos inoculados com a estirpe vacinal atenuada *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato. Todavia, ao se realizar a razão IgG2b/IgG1, foi observado que apenas a formulação *B. ovis* γ -irradiada + Montanide ISA 61 obteve valor maior que 1, sugerindo predomínio de resposta imune Th1.

No modelo murino de brucelose, a carga bacteriana reduzida no baço e fígado de camundongos vacinados em comparação àqueles não vacinados é o critério normalmente usado para determinar as respostas protetoras induzidas por uma vacina (Dabral *et al.*, 2014). Com base nessas definições, as formulações vacinais associadas a *B. ovis* gama irradiada utilizadas nesse estudo não conferiram proteção aos animais. Além disso, elas não reduziram as lesões inflamatórias no baço e fígado dos camundongos submetidos ao desafio com estirpe virulenta quando comparadas aos animais não imunizados, ainda que as formulações associadas ao Montanide ISA 61 tenham apresentando valores de escore histopatológico inferiores. A falha na imunidade protetora conferida pela vacina inativada por raios gama nesse estudo, difere dos resultados obtidos por Sanakkayala *et al.* (2005), Moustafa *et al.* (2011) e Dabral *et al.* (2014). No trabalho de Moustafa *et al.* (2011) foi demonstrado que a vacinação de camundongos com *B. neotomae* gama-irradiada induzia imunidade protetora

contra as estirpes virulentas de *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis*. Para isso, a exposição à irradiação gama foi realizada em dose mínima de 300–350 kilorad como meio de abolir a capacidade de replicação bacteriana. A mesma estratégia foi adotada no trabalho de Dabral *et al.* (2014), no qual somente a associação da vacina *B. neotomae* gama-irradiada administrada por via oral seguida de segunda dose de RB51 gama irradiada, conseguiu conferir proteção aos camundongos desafiados intraperitonealmente com a estirpe virulenta *B. abortus* 2308. De forma geral, os autores citam essa metodologia desenvolvida recentemente como uma possível estratégia para impedir a replicação do organismo e desenvolver vacinas mais seguras para doenças causadas por patógenos intracelulares.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, os biopolímeros alginato e quitosana, bem como a emulsão Montanide ISA 61 demonstraram incitar uma resposta local intensa e duradoura, sobretudo, quando associados ao antígeno. Contudo, o Montanide apresentou menor reatogenicidade quando comparado aos demais. No que se refere à imunogenicidade, as formulações *B. ovis* γ -irradiada revestida por alginato-quitosana, *B. ovis* γ -irradiada associada a Montanide ISA 61 bem como a estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ revestida por alginato apresentaram títulos elevados de IgG2b, importante marcador de resposta imune celular em camundongos C57BL/6. Todavia, as formulações com a vacina *B. ovis* γ -irradiada falharam em conferir imunidade protetora aos animais. Em contrapartida, a vacina com a estirpe mutante *B. ovis* $\Delta abcBA$ revestida por alginato conferiu proteção contra o desafio, corroborando com resultados de estudos anteriores. A associação da estirpe mutante a emulsão Montanide ISA 61, adjuvante que demonstrou menor reatogenicidade e boa resposta humoral, se mostra como alternativa viável para possíveis estudos futuros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A.; KAHL-MCDONAGH, M.M. et al. Immunization with a single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infection and Immunity*, v.76, p.2448-2455, 2008.

ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A.; KAHL-MCDONAGH, M.M. et al. The *Brucella abortus* S19 $\Delta vjbR$ live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infection and Immunity*, v.77, n.2, p.877-884, 2009a.

ARENAS-GAMBOA, A.M.; FICHT, T.A.; DAVIS, D.S. et al. Enhanced immune response of red deer (*Cervus elaphus*) to live BR51 vaccine strain using composite microspheres. *Journal of Wildlife Diseases*, v.45, p.165-173, 2009b.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, v.19, p. 2666-2672, 2001.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S. et al. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*, v.1, p.111-118, 2002.

BAUDNER, B.C.; MORANDI, M.; GIULIANI, M.M. et al. Modulation of immune response to group C meningococcal conjugate vaccine given intranasally to mice together with the LTK63 mucosal adjuvant and the trimethyl chitosan delivery system. *Journal of Infectious Diseases*, v.189, p.828-832, 2004.

BISWA, S.; CHATTOPADHYAY, M.; SEN, K.K.; SAHA, M.K. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate Polymers*, v.121, p.403-410, 2015.

BORGES, O.; SILVA, M.; SOUSA, A. et al. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *International Immunopharmacology*, v.8, n.13-14, p.1773-1780, 2008.

BUETER, C.L.; LEE, C.K.; WANG, J.P. et al. Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. *The Journal of Immunology*, v.192, p.5943-5951, 2014.

CAETANO, L.A.; ALMEIDA, A.J.; GONÇALVES, L. Effect of experimental parameters on alginate/chitosan microparticles for BCG encapsulation. *Marine Drugs*, v.14, p.1-28, 2016.

CAI, D.; SONG, Q.; DUAN, C. et al. Enhanced immune responses to E2 protein and DNA formulated with ISA 61 VG administered as a DNA prime–protein boost regimen against bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine*, v.36, p.5591-5599, 2018.

CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Meta-analysis of brucellosis vaccinology in natural hosts. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.40, p.604-613, 2020.

CARVALHO, T.P.; RIBEIRO, N.Q.; MOL, J. P. *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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.40, p.88-96, 2020.

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

CARVALHO NETA, A.V.C.; MOL, J.P.; XAVIER, M.N. *et al.* Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, v.184, n.2, p.146-155, 2010.

CASSATRO, J.; PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M. *et al.* A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*, v.25, p.4437-4446, 2007.

CHA, S.B.; KIM, W.S.; KIM, J. S. *et al.* Repeated aerosolized-boosting with gamma-irradiated *Mycobacterium bovis* BCG confers improved pulmonary protection against the hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 in mice. *PLOS One*, v.10, p.1-19, 2015.

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

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 Research Notes*, v.9, p.1-5, 2016.

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. *Microbiology and Immunology*, v.64, p.730-736, 2020.

DABRAL, N.; SRIANGANATHAN, N.; VEMULPALLI, R. Oral immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* induces protection against intraperitoneal and intranasal challenge with virulent *B. abortus* 2308. *PLOS One*, v.9, p.1-12, 2014.

DABRAL, N.; BURCHAM, G.N.; JAIN-GUPTA, N. et al. Overexpression of wbkF gene in *Brucella abortus* RB51WboA leads to increased O polysaccharide expression and enhanced vaccine efficacy against *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M, and *B. suis* 1330 in a murine brucellosis mode. *PLOS One*, v.14, p.1-21, 2019.

DÍAZ, A.G.; CLAUSSE, M.; PAOLICCHI, F.A. et al. Immune response and serum bactericidal activity against *Brucella ovis* elicited using a short immunization schedule with the polymeric antigen BLSOmp31 in rams. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.154, p.36-41, 2013.

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, p.1-20, 2020.

EISENBERG, T.; HAMANN, H.P.; KAIM, U. et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied Environmental Microbiology*, v.78, p.3753-3755, 2012.

ELDERBROOK, M.; SCHUMAKER, B.; CORNISH, T. et al. Seroprevalence and risk factors of *Brucella ovis* in domestic sheep in Wyoming, USA. *BMC Veterinary Research*, v.15, p.1-16, 2019.

ESTES, D.M.; BROWN, W.C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.90, p.1-10, 2002.

FORNEFETT, J.; KRAUSE, J.; KLOSE, K. et al. Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent *Rodentibacter pneumotropicus* (*Pasteurella pneumotropica*) strain. *BMC Microbiology*, v.18, p.1-11, 2018.

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

- FUIGUEIREDO, P.; FICHT, T.A.; RICE-FICHT A. et al. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis Review of Brucellae Host Interactions. *The American Journal of Pathology*, v.185, p.1505-1517, 2015.
- GARÇON, N.; LEROUX-ROELS, G.; CHENG, W.F. Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology*, v.1, p.89-113, 2011.
- GOMAA, A.M.; EL TANTAWY, N.L.; ELSAWEY, A.M. et al. The course of infection with *Toxoplasma gondii* RH strain in mice pre-vaccinated with gamma irradiated tachyzoites. *Experimental Parasitology*, v.205, p.1-10, 2019.
- GONG, Y.; TAO, L.; WANG, F. et al. Chitosan as an adjuvant for a *Helicobacter pylori* therapeutic vaccine. *Molecular Medicine Reports*, v.12, p.4123-4132, 2015.
- GRILLÓ, M.J.; BLASCO, J.M.; GORVEL, J.P. et al. What have we learned from brucellosis in the mouse model?. *Veterinary research*, v.43, p.1-35, 2012.
- GRIFFITHS, K.L.; KHADER, S.A. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Current Opinion in Immunology*, v.28, p.58-63, 2014.
- HAMMERL, J.A.; GOLLNER, C.; DAHOUK, S. et al. Analysis of the first temperate broad host range brucellaphage (BiPBO1) isolated from *B. inopinata*. *Frontiers in Microbiology*, v.7, p.1-13, 2016.
- HIRAMOTO, R.M.; GALISTEO JR, A.J.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE JR., H.F. 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine*, v.20, p.2072-2081, 2002.
- HOFER, E.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; DAHOUK, A.S. et al. A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Veterinary Microbiology*, v.155, p.93-99, 2012.
- HUA, R.H.; HUO, H.; Li, Y.N. et al. Generation and efficacy evaluation of recombinant classical swine fever virus E2 glycoprotein expressed in stable transgenic mammalian cell line. *PLOS One*, v.9, p.1-9, 2014.

HUNTIMER, L.; RAMER-TAIT, A.E.; PETERSEN, L.K. et al. Evaluation of biocompatibility and administration site reactogenicity of polyanhydride-particle-based platform for vaccine delivery. *Advanced Healthcare Materials*, v.2, p.369-378, 2013.

IBRAHIM, E.E.S; GAMAL, W.M.; HASSAN, A.I. et al. Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Veterinary World*, v.8, p.1189-1198, 2015.

JANG, S.I.; LILLEJOJ, H.S.; LEE, S.H. et al. Immunoenhancing effects of Montanide™ ISA oil-based adjuvants on recombinant coccidia antigen vaccination against *Eimeria acervulina* infection. *Veterinary Parasitology*, v.172, p.221-228, 2010.

JWA, M.Y.; JEONG, S.; KO, E.B. et al. Gamma-irradiation of *Streptococcus pneumoniae* for the use as an immunogenic whole cell vaccine. *Journal of Microbiology*, v.56, p.579-585, 2018.

KARAKUS, G.S.; TASTAN, C., KANCAGI, D.D et al. Preclinical efficacy and safety analysis of gamma-irradiated inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Scientific Reports*, v.11, p.1-19, 2021.

KHORASANI, A.; MADADGAR, O.; SOLEIMANJAH, H. et al. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v.17, p.8-12, 2016.

LI, J.; CAI, C.; LI, J. et al. Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. *Molecules*, v.23, p.1-26, 2018

MAGNANI, D.M.; HARMS, J.S.; DURWARD, M.A.; SPLITTER, G.A. Non dividing but metabolically active gamma-irradiated *Brucella melitensis* is protective against virulent *B. melitensis* challenge in mice. *Infection and Immunity*, v.77, p.5181-5189, 2009.

MARTIN, R.M.; BRADY, J. L.; LEW, A.M. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *Journal of Immunological Methods*, v.212, p.187-192, 1998.

MOUSTAFA, D.; GARG, V.K.; JAIN, N. et al. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. *Vaccine*, v.29, p.784-794, 2011.

OLIVEIRA, J.B.S. Avaliação de diferentes adjuvantes poliméricos associados à candidata vacinal *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ em modelo murino de infecção por *Brucella ovis*. 2021. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal/Patologia Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; XAVIER, M.N. et al. Innate immunity in brucellosis. *Res. Adv. in Infection and Immunity*, v.1, p.21-37, 2009.

PAPPAS, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.36, p.8-11, 2010.

PETERMANN, J.; BONNEFOND, R.; MERMOUD, I. et al. Evaluation of three adjuvants with respect to both adverse effects and the efficacy of antibody production to the Bm86 protein. *Experimental and Applied Acarology*, v.72, p.303-315, 2017.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Scientific and Technical Review - International Office of Epizootics*, v.32, p.105-115, 2013.

REED, S.G.; ORR, M.T.; FOX, C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, v.19, p.1597-1608, 2013.

RIDLER, A.L.; WEST, D.M.; STAFFORD, K.J. et al. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. *New Zealand Veterinary Journal*, v.48, p.57-59, 2000.

ROCHA, C.E.V. Avaliação de candidatas à vacina contra listeriose em modelo murino. 2020. 95f. Tese (Doutorado em Patologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROCHA, C.E.; SILVA, M.F.; GUEDES, A.C. et al. Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.176, p.567-577, 2021.

ROSSETTI, C.A.; GALINDO, C.L.; LAWHON, S.D. et al. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*: host initial interactions. *BMC Microbiology*, v.9, p.1-14, 2009.

- ROUX, C.M.; ROLAN, H.G.; SANTOS, R.L. et al. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cellular Microbiology*, v.9, p.1851-1869, 2007.
- SANAKKAYALA, N.; SOKOLOVSKA, A.; GULANI, J. et al. Induction of antigen specific Th1-type immune responses by gamma-irradiated recombinant *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.12, p.1429-1436, 2005.
- SANCHO, P.T.; TEJEDOR, C.; SIDHU-MUNHÖZ, R.S.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. et al. Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Veterinary Research*, v.45, p.1-10, 2014.
- SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M.; PAIXÃO, T.A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.759-764, 2013.
- SAREI, F.; DOUNIGHI, N.M.; ZOLFAGHARIAN, H. et al. Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.75, p.1-25, 2013.
- SEVERINO, P.; SILVA, C.F.; ANDRADE, L.N. et al. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Pharmaceutical Design*, v.25, p.1312-1334, 2019.
- SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A. et al. Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2011, p.1-9, 2011.
- SILVA, A.P.C.; MACEDO, 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.22, p.789-797, 2015a.
- SILVA, A.P.C.; MACEDO, 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.
- SKENDROS, P.; PAPPAS, G.; BOURA, P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes and Infection*. v.13, p.134-142, 2011.

- SKENDROS, P.; BOURA, P. Immunity to brucellosis. *Scientific and Technical Review - International Office of Epizootics*, v.32, p.137-147, 2013.
- STARR, T.; NG, T.W.; WEHRLY, T.D. et al. *Brucella* Intracellular Replication Requires Trafficking Through the Late Endosomal/Lysosomal Compartment. *Traffic*, v.9, p.678-694, 2008.
- SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; JIMÉNEZ-ROJAS, C. et al. *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, v.23, p.997-1000, 2017.
- SUN, H.X.; XIE, Y.; Ye, Y.P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, v.27, p.1787-1796, 2009.
- TAFFALA, C.; BØGWALD, J.; DALMO, R.A. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, v.35, p.1740-1750, 2013.
- TITBALL, R.W. Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discovery Today*, v.13, p.596-600, 2008.
- TOLLERSRUD, T.; ZERNICHOW, L.; ANDERSEN, S.R. et al. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine*, v.19, p.3896-3903, 2001.
- TRAMPUZ, A.; PIPER, K.E.; STECKELBERG, J.M.; PATEL, R. Effect of gamma irradiation on viability and DNA of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, p.1271-1275, 2006.
- VELIKOVSKY, C.A.; GOLDBAUM, F.A.; CASSATARO, J. et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infection and Immunity*, v.71, p.5750-5755, 2003.
- XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; HARTIGH, A.B. et al. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, v.4, p.109-118, 2010.

XAVIER, M.N.; WINTER, M.G.; SPEES, A.M. et al. CD4⁺ T Cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLOS pathogens*, v.9, p.1-17, 2013.

YAN, X.; ZHOU, M.; YU, S. et al. An overview of biodegradable nanomaterials and applications in vaccines. *Vaccine*, v.38, p.1096-1104, 2019.

ZHENG, X.; YANG, X.; Li, X. et al. Omp16-based vaccine encapsulated by alginatechitosan microspheres provides significant protection against *Haemophilus parasuis* in mice. *Vaccine*, v.35, p.1417-1423, 2017.

ZHUGUNISSOV, K.; BULATOV, Y.; TARANOV, D. et al. Beta-propiolactone inactivated bivalent bluetongue virus vaccine containing Montanide ISA-71VG adjuvant induces long-term immune response in sheep against serotypes 4 and 16 even after 3 years of controlled vaccine storage. *Veterinary Microbiology*, v.226, p.23-30, 2018.