



Revisión de la patogénesis molecular del aborto por *Brucella*

Rossetti, C.A.^{1,2}

¹Instituto de Patobiología – Instituto de Patobiología Veterinaria (IP-IPVET), UEDD INTA-Conicet. Nicolas Repetto y de Los Reseros (s/n), (B1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. ²CONICET. Godoy Cruz 2290 (C1425) CABA, Argentina. ✉ rossetti.carlos@inta.gov.ar

Resumen

La brucelosis es una enfermedad infecciosa crónica, zoonótica, de amplia distribución mundial causada por bacterias del género *Brucella* spp. En las especies animales susceptibles, el principal y muchas veces único signo clínico es el aborto. El aborto, además de producir pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias, es el elemento más importante para que la enfermedad se disemine y perpetúe, generando también problemas en la salud pública. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce acerca de los mecanismos moleculares que lo ocasionan. *Brucella* spp. muestra un especial tropismo por el útero gestante en el último tercio de la preñez, donde sobrevive y se reproduce en el interior de los trofoblastos. El alto número de bacterias dentro de los trofoblastos desencadena la apoptosis de las células infectadas por estrés del retículo endoplásmico. La destrucción masiva de trofoblastos resulta en una placentitis fibrino-necrótica, que dificulta el intercambio nutricional y gaseoso entre la madre y el feto, y la interrupción de la gestación se produce cuando los placentomas sobrevivientes no son suficientes para mantener activa la gestación. La interacción de *Brucella* con los trofoblastos no se ha estudiado en detalle, y muchos eventos de esa interacción, se infieren a partir de las observaciones en otros tipos celulares. En este artículo se describen los factores de virulencia de *Brucella* que intervienen en la adherencia, invasión y replicación intratrofoblástica de la bacteria, y las consecuencias locales que desencadena, y se discute la acción preventiva de la vacunación sobre el aborto. Finalmente se muestran varios modelos de estudio *in vitro* o *ex vivo* disponibles que no han sido explotados y que podrían brindar mayores datos sobre la patogenia molecular del aborto por *Brucella*.

Palabras clave: Trofoblastos, citoquinas, hormonas, vacunas, modelos de infección.

Review of the molecular pathogenesis of *Brucella* abortion

Abstract. Brucellosis is a global chronic zoonotic infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella* spp. It causes economic losses in livestock and public health problem. Abortion is the main clinical sign and is the most important vehicle for dissemination and maintenance of the disease. However, knowledge of the molecular mechanisms of the abortion is very limited. *Brucella* spp. shows a special tropism for the pregnant uterus in the last third of the gestation, where it survives and replicates inside the trophoblasts. The high number of bacteria within trophoblasts induces apoptosis of infected cells due to endoplasmic reticulum stress. The massive destruction of trophoblasts leads to fibrino-necrotic placentitis, which prevents nutritional and gas exchange between the mother and the fetus. Interruption of pregnancy occurs when healthy placentomes are not sufficient to maintain the gestation. The interaction between *Brucella* and trophoblasts has not been studied in detail, and many scenarios of this interaction are inferred from observations in other cells. This article discusses the *Brucella* virulence factors that are part of the adhesion, invasion and intratrophoblastic replication of the bacteria, and the local consequences that occur, together with the preventive action of the vaccines on the abortion. Finally, several available *in vivo* and *ex vivo* models of study that have not been fully explored and that could help obtain more information about the molecular pathogenesis of *Brucella* abortion are presented.

Key words: Tophoblasts, cytokines, hormones, vaccines, infection models.

INTRODUCCIÓN

Brucella es una bacteria cocobacilar Gram negativa, aerobia/microaerófila, no mótil, no esporulada ni encapsulada, perteneciente a la familia *alfa*-Proteobacteria. Al igual que otros agentes patógenos de la misma familia, tales como *Bartonella*, *Rickettsia* y *Anaplasma*, presenta un estilo de vida parasítico intracelular. Las bacterias del género *Brucella* se encuentran filogenéticamente relacionadas con patógenos oportunistas del género *Ochrobactrum* como así también con bacterias asociadas a plantas, como es el caso de los géneros *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* (Moreno et al. 1990).

El género *Brucella* es un género bacteriano en expansión. En la actualidad consta de 12 especies, cuya clasificación se basa tradicionalmente en la preferencia por el hospedador. De las 6 especies tradicionales, *B. abortus* afecta principalmente a bovinos, *B. melitensis* a caprinos y ovinos, *B. canis* a caninos, *B. ovis* a ovinos, *B. suis* a porcinos y *B. neotomae* a roedores. En los últimos años se han aislado e identificado nuevas especies, como *B. ceti* de cetáceos como ballenas y delfines, *B. pinnipediae* a partir de las focas y elefantes marinos, *B. microti* aislada a partir de un roedor de campo (*Microtus arvalis*) y del suelo en Europa Central, *B. inopinata*, aislada de anfibios y ratas australianas, *B. vulpis* de dos zorros colorados en Austria, y *B. papionis* aislada de babuinos (monos) (Roop et al. 2021) (Tabla 1). Asimismo, hay un grupo de aislamientos denominados “atípicos” que esperan ser taxonómicamente

descritos y confirmados como nuevas especies dentro del género *Brucella* (Jař et al. 2020, About et al. 2023, Hernández-Mora et al. 2023).

Brucella spp. es el causante de la brucelosis, una enfermedad infecciosa crónica distribuida en todo el mundo, que se caracteriza por afectar a un variado rango de hospedadores, como se mencionó previamente, que van desde roedores a anfibios, y de ungulados a mamíferos marinos y al hombre. En los animales susceptibles la principal, más importante y muchas veces única manifestación clínica en las hembras es el aborto, así como la inflamación de vesículas seminales, epidídimos y testículos en los machos (Carvalho Neta et al. 2010). El aborto es crucial para el ciclo de vida de *Brucella*, ya que es la forma en que la bacteria se asegura la exteriorización en gran número y la potencial transmisión a otro hospedador susceptible. A pesar de la importancia que tiene la brucelosis como enfermedad reproductiva y de los inconvenientes económicos para las explotaciones pecuarias y de salud pública que representa, los conocimientos acerca de los mecanismos involucrados en la inflamación placentaria y el aborto son limitados.

El objetivo de este artículo de revisión es integrar los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares utilizados por la bacteria para colonizar los trofoblastos placentarios y describir los procesos que se desencadenan durante la interacción *Brucella*: placenta y que llevan a la interrupción de la gestación.

Tabla 1. Especies del género *Brucella* reconocidas hasta el presente y sus características principales.

Especie	Número de biovares	Hospedador primario	Otros hospedadores	Aspecto de la colonia	Potencial zoonótico
<i>B. melitensis</i>	3 (1-3)	Cabras	Ovejas, camellos y bovinos	Lisa	Alto
<i>B. suis</i>	5 (1-5)	Suidos (bv 1-3), Liebres (bv2), ciervos, caribú (bv4), roedores (bv5)	Bovinos, caninos, caprinos	Lisa	Moderado a alto
<i>B. abortus</i>	8 (1-7, 9)	Bovinos, búfalos, bisontes	Cabras, camellos, equinos, hurón, carpinchos	Lisa	Moderado
<i>B. canis</i>	---	Caninos domésticos y salvajes (lobos, coyotes)	---	Rugosa	Bajo
<i>B. ovis</i>	---	Ovinos	---	Rugosa	---
<i>B. neotomae</i>	---	Rata del desierto (<i>Neotoma lepida</i>)	---	Lisa	Posible
<i>B. ceti</i>	---	Cetáceos	ND	Lisa	Posible
<i>B. pinnipedialis</i>	---	Pinnípedos	Cetáceos	Lisa	ND
<i>B. inopinata</i>	---	Ranas, ratas nativas australianas	ND	Lisa	Posible
<i>B. microti</i>	---	Ratón de campo (<i>Microtus arvalis</i>), suelo	Jabalí, zorro rojo	Lisa	Posible
<i>B. vulpis</i>	---	ND	Zorro rojo	Lisa	ND
<i>B. papionis</i>	---	Mono papión o babuino	ND	Lisa	ND

ND = no determinado

Patogénesis del aborto por *Brucella* spp. Los macrófagos y los trofoblastos son los 2 tipos celulares necesarios para que *Brucella* cumpla su ciclo infeccioso. El éxito de la infección de *Brucella* se debe a una estrategia conocida como “colonización sigilosa” debido a su capacidad de infectar a un hospedador susceptible ocultándose en el interior de los fagocitos mononucleares y desde allí manejar la respuesta inmune en su propio beneficio, que le permite alcanzar su nicho replicativo antes de que se monte una respuesta inmune adaptativa en su contra (Martirosyan et al. 2011). Por otro lado, *Brucella* coloniza y se reproduce en los trofoblastos (las principales células que forman la placenta), a los que luego lisa para exteriorizarse e infectar a un nuevo hospedador susceptible (Samartino y Enright 1993).

La transmisión de *Brucella* y su persistencia en una población determinada requiere de la presencia de animales infectados y susceptibles. La vía oral a través del contacto con descargas vaginales, fluidos o tejidos asociados con el parto o el aborto de fetos infectados, como así también por el consumo de leche materna infectada, es la vía de ingreso más frecuente para *B. abortus* y *B. melitensis* (Adams 2002). La placenta de vacas infectadas con *B. abortus* puede contener hasta 1×10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1} en líquido alantoico y 1×10^{13} UFC g^{-1} de tejido en los cotiledones (Alexander et al. 1981, Hensel et al. 2020b), representando un importantísimo foco de infección para otros hospedadores susceptibles, mientras que la expulsión por leche es intermitente. Para el caso de *B. ovis*, *B. canis* y *B. suis* la transmisión venérea es también una importante ruta de infección (Adams 2002). En estos casos, la excreción se da a través de la orina y semen, de modo que, en caninos, porcinos y entre carneros, tanto los machos como las hembras contribuyen de manera importante en la transmisión de la enfermedad.

Luego de atravesar la capa mucosa epitelial, la bacteria es captada por las células presentadoras de antígenos (CPA; dendríticas y macrófagos tisulares) y transportada hacia los nódulos linfáticos regionales. La sobrevivencia intracelular representa una ventaja para las especies de *Brucella*, ya que les permite moverse dentro del hospedador de manera protegida, limitando su exposición al sistema inmune. Si la respuesta inmune no logra frenar la infección en el linfonódulo primario, la bacteria se replica localmente y se disemina por vía sanguínea o linfática hacia otros órganos y tejidos, preservándose preferentemente en los del sistema retículo endotelial (SRE; ganglios linfáticos, bazo, médula ósea, células de Küpffer del hígado) y del aparato genito-urinario (vejiga, útero, epidídimo, glándulas seminales) (Rossetti et al. 2022).

Brucella spp. muestra un especial tropismo por el útero gestante, y particularmente por los trofoblastos, a los que coloniza, utiliza para reproducirse en su interior, y más tarde destruye para exteriorizarse vía vaginal, e iniciar un nuevo ciclo infeccioso en otro hospedador susceptible (Samartino y Enright 1993). Si al momento de la infección, el útero no está gestando, o lo está en etapas tempranas de la preñez, la respuesta inmune puede neutralizar la infección o la bacteria permanece a resguardo expectante en el SRE a la espera de que se produzcan los cambios fisiológicos y hormonales necesarios para la colonización. Los estudios

iniciales fijaron el concepto de que *Brucella* era atraída y se localizaba en la placenta de rumiantes y cerdos al final de la gestación, por la alta concentración de eritritol que estas presentaban (Smith et al. 1962). Este polialcohol no solo promueve el crecimiento, sino que también induce la expresión de factores de virulencia de la bacteria, como el sistema de secreción tipo 4 (SST4) y las proteínas flagelares (Rodríguez et al. 2012, Petersen et al. 2013). Así mismo, se vio que la mutación en alguno de los 4 genes (*eryA*, *eryB*, *eryC* y *eryD*) que participan del catabolismo del eritritol (operón *ery*), interferían con la sobrevivencia y multiplicación intracelular de *Brucella* (Zhang et al. 2016). Sin embargo, está documentado que *Brucella* es capaz de infectar las placentas y producir abortos en humanos (Salcedo et al. 2013, Inan et al. 2019), ratones y cobayos (Wang et al. 2014, Hensel et al. 2020a), donde el eritritol no es un elemento destacado; o que *B. ovis*, *B. canis* y la cepa S19 de *B. abortus* no catabolizan al eritritol, pero aun así se reproducen en los trofoblastos (Samartino y Enright 1992, Fernández et al. 2017, Sidhu-Muñoz et al. 2018) y generan abortos e infecciones genitales en ovinos, caninos y bovinos, respectivamente (Carmichael y Kenney 1968, Blasco 1990, Ledwaba et al. 2021). Estas particularidades fueron recientemente aclaradas en un estudio en el que se identificó que, si bien el eritritol es la fuente de carbono y energía preferencial de *Brucella*, en la placenta también se encuentran otros elementos como glicerol, lactato y glutamato, que sirven de sustrato y permiten un eficiente crecimiento de la bacteria (Letesson et al. 2017).

Brucella arriba a la placenta por vía sanguínea o linfática, en el interior de las células fagocíticas, eritrocitos o libre (Roop et al. 2004, Vitry et al. 2014). Inicialmente coloniza unos trofoblastos especializados en la fagocitosis de macromoléculas, especialmente de sangre materna extravasada, llamados trofoblastos eritrofagocíticos (Anderson et al. 1986, Igwebuike 2006), donde se multiplica masivamente en su interior. El alto número de bacterias dentro de los trofoblastos desencadena la apoptosis de las células infectadas por estrés del retículo endoplásmico (RE) (Wang et al. 2016), y la liberación masiva de microorganismos a la luz uterina. A continuación, *Brucella* coloniza y replica en los trofoblastos corio-alantoideos adyacentes, repitiéndose los procesos de muerte celular y liberación bacteriana, seguida de endocitosis (o penetración activa) y multiplicación intracelular. Finalmente, la destrucción masiva de trofoblastos resulta en una ulceración de la membrana corioalantoidea, que dificulta el intercambio nutricional y gaseoso entre la madre y el feto, y favorece la diseminación hematogena de *Brucella* a las vellosidades coriónicas y a los tejidos fetales (Anderson et al. 1986). La proliferación de *Brucella* en el tejido conectivo del corion produce una vasculitis y una infiltración de neutrófilos e histiocitos con deposición de fibrina, ocasionando la separación de los trofoblastos de los tejidos maternos (Carvalho Neta et al. 2010). La interrupción de la gestación se produce cuando los placentomas sobrevivientes no son suficientes para mantener activa la gestación (Xavier et al. 2009).

Al mismo tiempo, *Brucella* coloniza al feto por vía sanguínea (venas umbilicales) y oral (ingestión y “aspiración” del líquido amniótico infectado: de allí que

el contenido abomasal y los pulmones sean las muestras de elección para el aislamiento de *Brucella* en fetos) y se distribuye por todo el organismo, encontrándose en mayor número en órganos altamente irrigados como el hígado y el bazo (Anderson et al. 1986, Xavier et al. 2009).

Colonización de los trofoblastos placentarios por *Brucella*. La interacción de *Brucella* con los trofoblastos no se ha estudiado en detalle, y muchos eventos de esa interacción, se infieren a partir de las observaciones de la infección de *Brucella* a otros tipos celulares, principalmente macrófagos y células epiteliales. Así, los mecanismos de adhesión de *Brucella* a los trofoblastos podría pensarse como un suceso similar a la interacción inicial de *Brucella* con las células epiteliales; esto es, la expresión polar de moléculas de adhesión que median la unión con receptores celulares. Hasta el momento se identificó a la proteína afin de choque térmico (Hscp70) como una adhesina candidata (Watanabe et al. 2008), aunque otras potenciales candidatas podrían ser las adhesinas no fimbriales Sp29 (del C Rocha-Gracia et al. 2002), Sp41 (Castañeda-Roldán et al. 2006), BigA/B (Czibener et al. 2016, Lopez et al. 2020), BmaA/B/C (Posadas et al. 2012, Bialer et al. 2021), BtaE/F (Ruiz-Ranwez et al. 2013a,b) y BMEI0216 (Hernández-Castro et al. 2008) que se unen a otros receptores no caracterizados de las células epiteliales (Castañeda-Roldán et al. 2004). Los estudios *in vitro* demostraron que la unión produce un reacomodamiento del citoesqueleto celular que conduce a una internalización activa de *Brucella* por parte de la célula hospedadora a través de un mecanismo conocido como de “cierre” (Rossetti et al. 2012).

Tras invadir a la célula, *Brucella* se localiza en el interior de una vacuola que recibe el nombre inicial de Vacuola Contenedora de *Brucella* (VCB) pero que va cambiando su denominación a medida que transcurre la ruta intracelular, en función de las fusiones de la VCB con organelas celulares y la adquisición o pérdida de marcadores de superficie (Wang et al. 2016). Así, en su primer estadio madurativo, la VCB interactúa con la vía endosomal temprana, y adquiere marcadores de superficie propios de esta vía (GTPasa Rab5, EEA 1 y TfR), pasando a denominarse VCB endosomal (VCBe). Rápidamente, a posteriori interactúa con la vía endosomal tardía, adquiriendo marcadores de superficie como Rab7 y CD63; y a continuación, transitoriamente se fusiona con unos pocos lisosomas, necesarios para acidificar el medio interno de la VCBe. La acidificación de la vacuola actúa como disparador para la transcripción del operón *virB* de *Brucella*, que codifica para el SST4 encargado de translocar moléculas efectoras desde el citoplasma bacteriano al interior celular (Celli 2019). Esas moléculas efectoras son las encargadas de manipular las vías y respuestas de la célula hospedadora; entre ellas modifican el tránsito intracelular de la VCBe, evitando la vía fagolisosomal de lisis bacteriana y re-dirigiéndola hacia otra vía que permite la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria. La primera consecuencia de esta modificación del tráfico intracelular es la fusión de la membrana de la VCBe con vacuolas derivadas del RE para generar la VCB replicativa (VCBr), producto de la translocación, entre otras, de las proteínas efectoras SepA, BspB y RicA, y su interacción

con las proteínas COG y Rab2 del hospedador. Hasta el momento se sabe que SepA excluye los marcadores moleculares de la superficie de la VCBe que favorecen la unión con los lisosomas, mientras que las otras dos moléculas interfieren en el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi, derivándolas hacia la formación de la VCBr (Roop et al. 2021).

En este punto, y por un mecanismo diferencial todavía no bien definido, el comportamiento de *Brucella* en el interior de los fagocitos mononucleares es opuesto a lo que sucede en los trofoblastos. Mientras que a los primeros los mantiene vivos, inhibiendo la apoptosis para que le sirvan de refugio y de vehículo para diseminarse por el hospedador sin ser reconocidos por el sistema inmune, en los trofoblastos induce un estrés persistente y excesivo del RE que lleva a la muerte celular programada (Wang et al. 2016) con la consecuente liberación de bacterias y la destrucción masiva de trofoblastos, el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria y la ulceración de la membrana corioalantoidea. Es probable que gran parte de las consecuencias observadas por la invasión de *Brucella* a los trofoblastos se deba a la acción de algunas moléculas efectoras translocadas por el SST4. Hasta el momento han sido identificadas 16 moléculas efectoras (Roop et al. 2021), pero solamente pudo comprobarse la participación directa de VceC en la placentitis y en la reducción de la viabilidad fetal observada durante la infección por *Brucella*, debido a la generación de un estrés persistente del RE del trofoblasto y posterior producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-alfa e IL-6) (Keestra-Gounder et al. 2016, Byndloss et al. 2019, Tsai et al. 2022). Entre las restantes proteínas efectoras caracterizadas, hay dos sobre las que se podría especular su participación en el aborto: BPE005 y BPE123. La proteína BPE005 ha demostrado favorecer la deposición de colágeno por los hepatocitos mediante la disminución en la secreción de la metaloproteínasa de la matriz extracelular 9 (MMP9) (Arriola Benitez et al. 2016). En trabajos independientes, la enzima MMP9 se observó ligada a abortos espontáneos (Balci y Özdemir 2019). El otro factor de virulencia, BPE123, modula la actividad de la enzima glucolítica α -enolasa (ENO-1) (Marchesini et al. 2016). En estudios de la reproducción, se demostró la influencia que ENO-1 ejerce sobre la secreción de la gonadotropina coriónica y la progesterona (von Schönfeldt et al. 2016), dos hormonas íntimamente relacionadas con la gestación. Indudablemente la evaluación individual de estos factores de virulencia en líneas celulares o cultivos primarios de trofoblastos, o en animales de laboratorio gestantes permitirían definir su rol en la patogenia molecular de la placentitis y el aborto por *Brucella*.

Respuesta de la placenta y el feto a la infección por *Brucella*. La placenta es un órgano transitorio mixto, formado por tejidos maternos y fetales que permite el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto, secreta hormonas que favorecen la gestación y protege al feto del sistema inmune materno (Barbeito et al. 2010). Esto transforma al útero gestante en una zona inmunológicamente privilegiada, caracterizada por la ausencia o modificación de los antígenos de histocompatibilidad en los trofoblastos, la presencia de anticuerpos asimétricos que se unen a los

antígenos, pero no generan respuesta inmune, y la expansión de un subgrupo de LT (LT reguladores CD4⁺CD25⁺) que inducen inmunosupresión (Chaouat et al. 2002, Thuere et al. 2007). Esta inmunomodulación localizada favorecida por una respuesta inmune de tipo Th2 (protectora de la gestación) por sobre una respuesta Th1 (abortigénica) es aprovechada por *Brucella*, al igual que otros patógenos, para colonizar la placenta.

En estudios tanto *in vitro* (Samartino y Enright 1996) como *in vivo* (Crawford et al. 1987), se observó que *Brucella* tiene la capacidad de colonizar la placenta a cualquier edad de gestación, pero la replicación bacteriana es significativamente superior en placentas correspondientes a gestaciones tardías que tempranas. Si bien no se conocen hasta el momento las causas que originan esta susceptibilidad diferencial, la misma podría deberse a una modificación fisiológica y metabólica de los trofoblastos y de la placenta en general a medida que progresa la gestación. Un rol importante de los trofoblastos es la secreción de hormonas que juegan un papel clave en el aspecto reproductivo. En estudios *in vitro* con líneas celulares derivadas de trofoblastos humanos, se observó que la infección por *Brucella* spp. no afectaba la secreción de gonadotropina coriónica (Salcedo et al. 2013, García-Méndez et al. 2019), importante para la implantación del ovocito y progresión de la gestación, ni la capacidad de migrar e invadir los tejidos anexos por parte de los trofoblastos infectados, excepto los colonizados por *B. melitensis* (Salcedo et al. 2013, Wang et al. 2016, García-Méndez et al. 2019). Sin embargo, sí se observó una modificación en la producción y secreción de progesterona y estrógenos, las 2 hormonas más relevantes durante la gestación. Es sabido que, a lo largo de la gestación, la concentración de progesterona es alta y baja la de estrógeno, lo que se invierte poco antes del parto. En estudios *in vitro* se observó que los trofoblastos infectados con cepas de *Brucella* spp., aumentaban la producción de estrógenos en detrimento de la de progesterona (Wang et al. 2016). Este último hecho también fue demostrado *in vivo*, mediante la infección experimental de ratonas preñadas (Ren et al. 2021), lo que predispone a la interrupción anticipada de la gestación. Por otro lado, el aumento en el nivel de cortisol fetal registrado en bovinos y ovinos por el estrés generado por la infección por *Brucella*, también disminuye la producción de progesterona y aumenta la de estrógenos y de prostaglandina F2 α (PGF2 α) por el endometrio, sumando así nuevos elementos que contribuyen a la interrupción de la gestación y el parto anticipado (Enright 1990).

La progesterona es uno de los factores que contribuyen en la inmunomodulación del útero gestante, mediante la inducción de altos niveles de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y la inhibición de la activación del regulador transcripcional NF- κ B y consecuentemente una reducción de la producción de las citoquinas pro-inflamatorias (Robinson y Klein 2012, Ren et al. 2021). Sin embargo, el equilibrio inmunitario del útero gestante se desestabiliza durante la infección con *Brucella*, y contrariamente a lo que sucede durante la interacción *Brucella*: macrófago, se produce un estrés persistente del RE de los trofoblastos afectados que induce a la apoptosis celular y a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8,

TNF α , RANTES -CCL5-, GCP-2 -CXCL6-), seguido de la infiltración de neutrófilos y mononucleares en la placenta, con las consiguientes lesiones tisulares (Palmer et al. 1998, Carvalho Neta et al. 2008, Fernández et al. 2016, Keestra-Gounder et al. 2016, Hielpos et al. 2017, Liu et al. 2019, Tsai et al. 2022). Hasta el momento se ha identificado la activación de dos vías moleculares que inducen la respuesta inflamatoria en la placenta infectada. Por un lado, el estrés persistente del RE de los trofoblastos por la acumulación de proteínas mal plegadas en su interior, que conduce a la activación del receptor IRE1a (Keestra-Gounder et al. 2016, Wang et al. 2016). Por otro lado, *Brucella* aumenta la producción de la proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) en los trofoblastos infectados, la que activa los receptores de tipo Toll (TLR) (Liu et al. 2019). Ambos mecanismos activan la transcripción del regulador transcripcional NF- κ B que promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

En resumen, cuando *Brucella* coloniza el útero gestante compromete la preñez porque, 1) disminuye la secreción de progesterona por la placenta, lo que favorece el desencadenamiento del parto anticipado y el crecimiento intratrofoblástico del patógeno por la inhibición de las especies reactivas del oxígeno; 2) aumenta los niveles de cortisol generados por el feto y en consecuencia de PGF2 α ; y 3) desencadena una respuesta inflamatoria promovida por la secreción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias que estimulan el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y otras células inmunes que llevan a una placentitis cotiledonaria necrotizante purulenta con pérdida de la integridad y de las funciones del órgano.

Las vacunas contra brucelosis como preventivas del aborto. Como se mencionó previamente, el aborto es el signo clínico distintivo y quizá único de la brucelosis en las especies susceptibles. Sin embargo, la enfermedad tiene la particularidad de que los animales abortan 1 o a lo sumo 2 veces, y luego no vuelven a abortar, aunque permanecen infectados y excretan la bacteria con los fluidos vaginales después de cada parto (Carvalho Neta et al. 2010, Rossetti et al. 2022). Al ser *Brucella* un patógeno intracelular, las mejores respuestas protectoras se logran con cepas vivas atenuadas. Así, las 3 principales vacunas comercializadas en el mundo (*B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev.1) están conformadas por cepas vivas de virulencia atenuada que presentan un índice de protección a la infección y al aborto del 65 al 75% (de Oliveira et al. 2022). A pesar de ser atenuadas, las 3 cepas conservan afinidad por el útero gestante (Rev.1 > S19 > RB51) pudiendo generar abortos (Jimenez de Bagues et al. 1989, Fluegel Dougherty et al. 2013, Ledwaba et al. 2021, Meglia et al. 2023), por lo que está contraindicada su aplicación durante la gestación.

Luego de la vacunación (subcutánea o conjuntival), las cepas vacunales son rápidamente captadas por las células presentadoras de antígeno (CPA) locales y llevadas al ganglio linfático regional, donde se inicia la respuesta inmune. Allí, las CPA matan a la cepa vacunal, procesan los antígenos y los exponen en la superficie en el marco del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH-II) y moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86). Esa

presentación antigénica junto a la secreción de IL-12 y TNF α estimula la activación de los Th0 hacia una respuesta inmune adquirida Th1, consistente en la proliferación de LT-CD4 $^+$ y CD8 $^+$ citotóxicos, y la secreción de INF γ (Skendros y Boura 2013, Dorneles et al. 2015b).

La respuesta humoral también está presente, principalmente dirigida contra la cadena O del LPS (O-PS), pero es transitoria y rápidamente los animales se negativizan a las pruebas serológicas oficiales cuando son vacunados en la etapa pre-puberal (Fensterbank et al. 1987, Dorneles et al. 2015a). Similar a cualquier respuesta inmune post-vacunal, las IgM presentan una aparición temprana, pero de corta duración, mientras que las IgG aparecen a los 7 días y alcanzan su máximo nivel alrededor de las 3-4 semanas post-vacunación. IgG1 es la inmunoglobulina predominante en bovinos luego de la primo-vacunación con las cepas de *B. abortus* S19 o RB51 (Dorneles et al. 2015a), mientras que en cabrillas vacunadas con la cepa Rev.1 de *B. melitensis*, se observó que el isotipo predominante era IgG2, el cual es particularmente efectivo en opsonizar y consecuentemente favorecer la fagocitosis de la bacteria por unión de la región Fc al receptor Fc de los fagocitos (Castaño-Zubieta et al. 2021). Sin embargo, el rol de las inmunoglobulinas en la protección contra la infección por *Brucella*, está en discusión. Los estudios publicados (utilizando ratones, no bovinos) muestran en algunos casos, su contribución en la protección contra la infección (Montaraz et al. 1986), mientras que contrariamente otros trabajos sostienen que contribuyen a establecer la infección crónica (Goenka et al. 2011).

Cuando los animales vacunados se enfrentan a una cepa de campo o nuevamente a las cepas vacunales, se produce un rápido reconocimiento de la misma por parte de los receptores ubicados en la superficie de las CPAs (PRRs; receptores de reconocimiento de patrones antigénicos) principalmente los TLR2, 4 y 9. Además de la respuesta inmune innata (células NK, LT $\gamma\delta$, sistema complemento), las CPA secretan TNF α e IL-2, -6, -12 y -17, que activan los macrófagos, y producen una expansión clonal de los LT-CD4 $^+$ y -CD8 $^+$, y los LB de memoria. Esta rápida respuesta inmune adquirida facilitaría la captación de *Brucella* por los MO activados y su rápida eliminación (estallido respiratorio), y la destrucción de las células infectadas, impidiendo que *Brucella* pueda diseminarse por el hospedador y sobrevivir en latencia o alcanzar el útero gestante (Dorneles et al. 2015b, Meglia et al. 2023). A su vez, la respuesta humoral es principalmente de tipo IgG2 en los bovinos (Hall et al. 1988), pero como se mencionó anteriormente, su contribución en la protección no está definida. Igualmente, la efectividad de la respuesta inmune dependerá del estado inmunitario y fisiológico del hospedador, y de la concentración y virulencia del inóculo, vía de infección, y resistencia natural, entre otros factores predisponentes.

Sin duda se necesitan nuevas vacunas contra la brucelosis, que sean seguras (cepas no zoonóticas y que no produzcan aborto) y más eficaces (mayores índices de protección contra el aborto y la infección). En acuerdo con los conocimientos actuales, para cumplir con este último requisito el inmunógeno adecuado debiera inducir una respuesta inmune innata basada en una alta producción de IL-12 y TNF α , seguida de una respuesta inmune adaptativa

de tipo Th1, caracterizada por la secreción de INF γ por las células LT-CD4 $^+$, y la actividad citotóxica de los LT-CD8 $^+$ (Dorneles et al. 2015b).

Modelos para el estudio del aborto por *Brucella*. A pesar de que el aborto es la principal manifestación clínica de la brucelosis y que los perjuicios económicos que esta ocasiona en las explotaciones pecuarias son reconocidos, es muy poco lo que se sabe de la patogénia molecular del mismo. Las especies animales de producción susceptibles a la infección y al aborto (bovinos, porcinos, ovinos y caprinos) son indispensables para evaluar en un todo la patogénesis, las lesiones y la respuesta inmune, pero los ensayos *in vivo* empleando estas especies son costosos, demandantes, requieren niveles de bioseguridad muchas veces no disponibles, y en algunos casos, son éticamente cuestionables. Como consecuencia de ello, la alternativa es utilizar sistemas *in vitro*, *ex vivo* o animales de laboratorio (*in vivo*), cada uno con sus distintos grados de complejidad y contribución al conocimiento de la patogénia del aborto por *Brucella*.

Dado que la placenta es el terreno en el que se libra la batalla entre el hospedador y *Brucella*, y como resultado de esa interacción surgirá un aborto, un nacimiento prematuro o un animal viable, con o sin retención placentaria, es importante conocer las diferencias a nivel morfológico e histológico que presentan las distintas placentas de las especies animales susceptibles al aborto por *Brucella* (Tabla 2), lo que debe ser tenido en cuenta cuando se analizan y buscan extrapolarse los resultados obtenidos en ensayos experimentales.

Por su sencillez, bajo costo y practicidad los sistemas *in vitro* son los más utilizados. Estos sistemas son utilizados como punto de partida para demostrar, caracterizar o identificar conceptos básicos de la interacción del patógeno con el hospedador, como por ejemplo probar la influencia de los factores de virulencia bacterianos en la adhesión, internalización o sobrevivencia intracelular (Zhang et al. 2016, 2019), para estudiar el tráfico intracelular de la bacteria (Salcedo et al. 2013) o la respuesta de los trofoblastos frente a la infección (Fernández et al. 2016). Sin embargo, los resultados obtenidos deben ser evaluados cuidadosamente debido a la falta de innumerables factores presentes en un organismo vivo, como es la respuesta inmune, el medio ambiente incluyendo el microbiota, y el soporte tisular. Los modelos *in vitro* más básicos son bidimensionales, como las líneas celulares derivadas de trofoblastos placentarios o el cultivo primario de trofoblastos. Dentro de las líneas celulares, las más usadas para el estudio de la interacción *Brucella*: placenta se encuentran JEG-3, BeWo, HPT-8 y Swan-71 (Salcedo et al. 2013, Fernández et al. 2016, García-Méndez et al. 2019, Zhang et al. 2019), todas derivadas de placentas humanas. Curiosamente, las líneas celulares derivadas de epitelio caruncular bovino (BCEC-1) o cotiledones placentarios bovinos (F3) u ovinos (AH1), utilizadas para el estudio de la patogénia del aborto por otros patógenos (Wheelhouse et al. 2009, Jiménez-Pelayo et al. 2019) no han sido empleadas con *Brucella*. Contrariamente, si se utilizaron cultivos primarios de trofoblastos obtenidos a partir de placentas de especies animales susceptibles a la infección con *Brucella* como caninos (Fernández et al.

2017), bovinos (Carvalho Neta et al. 2008) y caprinos (Wang et al. 2016), para estudiar las consecuencias de la interacción con la bacteria. Por otro lado, los modelos *in vitro* tri-dimensionales (3D) representan un avance respecto a los cultivos celulares bi-dimensionales (2D), ya que las células crecen sobre un soporte sólido y establecen una

relación con el entorno en semejanza con lo que sucede *in vivo*, confiando mayor certeza y realismo a los resultados obtenidos. Sin embargo, no se han empleado para estudiar la interacción de *Brucella* con los trofoblastos, como si se han aprovechado con otros patógenos (Silberstein et al. 2021).

Tabla 2. Clasificación de las placentas de las especies de animales susceptibles al aborto por *Brucella*, según los parámetros morfológicos e histológicos. Se indican también las principales especies de *Brucella* causantes de abortos en las familias o especies animales mencionadas. En = endotelio, TC= tejido conectivo, Ep = Epitelio.

Parámetros morfológicos	Parámetros histológicos	Capas entre la sangre materna y la fetal							Familia / Especie animal susceptible	Principales especies de <i>Brucella</i> causantes de aborto
		Útero			Luz	Placenta				
		En	TC	Ep		Ep	TC	En		
Difusa	Epitelio corial	+	+	+	+	+	+	+	Cerdos	<i>B. suis</i> (bv 1-3)
									Camélidos	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i>
									Cetáceos	<i>B. ceti</i>
Cotiledonaria	Sinepitelio corial	+	+	-	+	+	+	+	Bóvidos Bubalinos Cérvidos	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i>
										<i>B. melitensis</i>
									Ovinos Caprinos	<i>B. abortus</i> <i>B. ovis</i>
Zonal	Endotelio corial	+	-	-	-	+	+	+	Caninos	<i>B. canis</i>
									Pinnípedos	<i>B. pinnipediae</i>
Discoidal	Hemocorial	-	-	-	-	-	+	+	Primates	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> <i>B. suis</i> , <i>B. papionis</i>
									Quirópteros	<i>B. nosferati</i>
	Hemo endotelial	-	-	-	-	-	-	+	Roedores ¹ Lagomorfos ¹	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ovis</i>

¹ experimental

Los modelos *ex vivo* están representados por trozos de órganos o tejidos vivos (explantes) que son mantenidos viables en el laboratorio por un corto periodo de tiempo. Estos modelos permiten llevar a cabo experimentos controlados y sus resultados son más fidedignos que

los obtenidos con los cultivos celulares. A pesar de la información distintiva que se puede extraer de estos sistemas, los explantes placentarios han sido muy poco utilizados para el estudio de la patogénesis de la placentitis y el aborto inducido por *Brucella*. Entre las posibles causas

que atentan contra el uso del modelo podemos atribuirlo a la dificultad instrumental, económica y ética que implica obtener los explantes rápidamente de forma estéril (Pastor-Fernández et al. 2020). De todos modos, a través de los ensayos llevados a cabo con explantes de placentas bovinas, se demostró que el crecimiento intratrofoblástico de *B. abortus* era mayor en placentas de la segunda mitad de la gestación que en aquellas obtenidas de gestaciones iniciales (Samartino y Enright 1996), y el modelo permitió caracterizar el perfil de citoquinas secretadas durante los primeros momentos post-infección en bovinos (Carvalho Neta et al. 2010) y caninos (Fernández et al. 2017), como también la respuesta transcripcional (Mol et al. 2014) y la identificación de las proteínas expresadas (Mol et al. 2016) tras la interacción inicial de la *Brucella* con la placenta.

Históricamente, los modelos animales han sido los modelos de elección para estudiar las consecuencias de la infección por *Brucella* durante la gestación, pero la imposición del concepto de las “3Rs” (reemplazar, reducir y refinar) y la necesidad de contar con autorización de los comités de cuidado y uso de animales de experimentación o laboratorio (CICUAE/Ls) para llevar a cabo los estudios *in vivo*, entre otros argumentos, han desalentado este tipo de ensayos. Las especies utilizadas para los estudios *in vivo* pueden dividirse en animales de laboratorio y hospedadores naturales. Dentro de las especies de animales de laboratorio, los ratones y los cobayos son las dos más utilizadas (Kim et al. 2005, Hensel y Arenas-Gamboa 2018). Ambas especies son susceptibles a las tres especies de *Brucella* que afectan la gestación en la producción pecuaria (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*), pero la patogenia del aborto y las lesiones observadas en la placenta deben ser extrapoladas con cuidado a los hospedadores naturales, debido a las diferencias anatómicas e histológicas presentes (Tabla 2). A su vez, dentro de los hospedadores naturales de las especies de producción para evaluar las consecuencias de la infección con *Brucella* durante la gestación se utilizaron los bovinos (Olsen y Johnson 2011), caprinos (Elzer et al. 2002), ovinos (Jimenez de Bagues et al. 1989) y porcinos (Zriba et al. 2019). Las ventajas y desventajas de usar un modelo animal por sobre otro o comparado con los ensayos *in vitro* o *ex vivo* han sido extensamente descritas y son ampliamente conocidas (motivos éticos, económicos, disponibilidad de instalaciones adecuadas, demanda de tiempo, esfuerzo, cantidad y calidad de los resultados obtenidos, etc), por lo que, en la actualidad las inoculaciones experimentales en las especies de granja quedan reservadas para las etapas finales de un estudio, cuando la mayor cantidad de variables ya ha sido previamente definida en estudios *in vitro* o *ex vivo*.

OBSERVACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

A pesar de la amplia distribución mundial de la brucelosis y de los problemas económicos que ocasionan los abortos por *Brucella* en las explotaciones pecuarias, es muy poco lo que se conoce sobre la patogénesis molecular de estos. Se sabe que *Brucella* coloniza el útero gestante con más afinidad en la segunda mitad de la gestación, probablemente debido a una alta disponibilidad de

sustratos (fuentes de carbono y energía) que permiten su rápido crecimiento. Allí, se multiplica en el interior de los trofoblastos iniciando un círculo vicioso de apoptosis celular, liberación masiva de las bacterias e invasión de los trofoblastos adyacentes. La destrucción masiva de trofoblastos lleva a una ulceración de la membrana corioalantoidea que dificulta el intercambio materno: fetal. Al mismo tiempo, *Brucella* modifica la relación hormonal (aumento de estrógenos y PGF2 α , disminución de progesterona) y desencadena una respuesta inflamatoria que altera el ambiente inmunomodulado que prima en el útero gestante. Para ello, el patógeno se vale de una serie de factores de virulencia (SST4 y translocación de moléculas efectoras) que manipulan el tránsito intracelular y la respuesta de la célula hospedadora en su propio beneficio. Las vacunas comercializadas están formuladas con cepas vivas de virulencia atenuada. Una vez inoculadas, desencadenan una respuesta inmune que controla la infección y prepara al sistema inmunitario para una respuesta rápida, eficaz y potente frente a una re-infección, impidiendo una bacteriemia y eventualmente la colonización del útero gestante. Las vacunas disponibles protegen hasta un 75% contra el aborto, por lo que se necesita desarrollar inmunógenos más eficaces, menos patogénicos y que permitan diferenciar la respuesta inmune frente a una infección.

Si bien se ha avanzado en los últimos años en el conocimiento de la patogenia del aborto por *Brucella*, todavía quedan muchos aspectos por descifrar. Por ejemplo, no se ha estudiado en detalle el tráfico intracelular de *Brucella* en los trofoblastos ni los factores de virulencia que intervienen para favorecer la colonización de la placenta, y muchas manifestaciones se explican extrapolando los conocimientos obtenidos de la interacción del patógeno con macrófagos o células epiteliales. Tampoco se conoce con exactitud cuáles son los elementos o que cambios fisiológicos que provocan la atracción de la bacteria hacia el útero gestante, ni cómo logra el patógeno modificar la relación hormonal durante la gestación o aprovecha para colonizar un órgano inmunológicamente protegido, como el útero gestante. Como se mencionó en el último punto del artículo, hay disponibles varios modelos *in vitro* y *ex vivo* que no han sido suficientemente explotados para el estudio de la patogénesis molecular del aborto por *Brucella*, y que podrían brindar información dirigida a probar hipótesis y responder algunos de estos interrogantes antes de comprobarlos en los hospedadores naturales.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el proyecto INTA PNSA-PD I105 y PICT 2018-3811.

ORCID

Rossetti, C.A.  <https://orcid.org/0000-0002-6932-2521>

REFERENCIAS

1. About F, Pastre T, Boutrou M, Martinez AY, Melzani A, Peugny S, Michaud C, Zouaoui S, Carage T, Rose V, Sainte Demar M, Lavigne J-P, Djossou F, O'Callaghan D, Epelboin L, Keriell A. Novel Species of *Brucella*

- Causing Human Brucellosis, French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29: 333–340.
2. Adams LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.* 2002; 90: 553–561.
 3. Alexander B, Schnurrenberger PR, Brown RR. Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows. *Vet. Rec.* 1981; 108: 500.
 4. Anderson TD, Cheville NF, Meador VP. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet. Pathol.* 1986; 23: 227–239.
 5. Arriola Benitez PC, Rey Serantes D, Herrmann CK, Pesce Viglietti AI, Vanzulli S, Giambartolomei GH, Comerci DJ, Delpino MV. The Effector Protein BPE005 from *Brucella abortus* Induces Collagen Deposition and Matrix Metalloproteinase 9 Downmodulation via Transforming Growth Factor β 1 in Hepatic Stellate Cells. *Infect. Immun.* 2016; 84: 598–606.
 6. Balci M, Özdemir G. Differential Expression of EGFR-1, MMP-3, and MMP-9 in Spontaneous Abortions, Induced Abortions, and Tubal Pregnancies. *Turk Patoloji Derg.* 2019; 35: 1–8.
 7. Barbeito CG, Galosi C, Monteavaro C, Portiansky E, Zanuzi C, Eory M, Fuentealba N, Gimeno E. Patología placentaria: conocimientos generados por estudios experimentales. *Ann. Acad. Nac. Agron. Vet.* 2010; 64: 87–117.
 8. Bialer MG, Ferrero MC, Delpino MV, Ruiz-Ranwez V, Posadas DM, Baldi PC, Zorreguieta A. Adhesive Functions or Pseudogenization of Type Va Autotransporters in *Brucella* Species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 607610.
 9. Blasco J. *Brucella ovis*, in: Nielsen, K., Duncan JR (Eds.), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990; pp. 351–378.
 10. Byndloss MX, Tsai AY, Walker GT, Miller CN, Young BM, English BC, Seyffert N, Kerrinnes T, de Jong MF, Atluri VL, Winter MG, Celli J, Tsolis RM. *Brucella abortus* Infection of Placental Trophoblasts Triggers Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Cell Death and Fetal Loss via Type IV Secretion System-Dependent Activation of CHOP. *MBio* 2019; 10.
 11. Carmichael LE, Kenney RM. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1968; 152: 605–616.
 12. Carvalho Neta AV, Stynen APR, Paixão TA, Miranda KL, Silva FL, Roux CM, Tsolis RM, Everts RE, Lewin HA, Adams LG, Carvalho AF, Lage AP, Santos RL. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 2008; 76: 1897–1907.
 13. Carvalho Neta A V, Mol JPS, Xavier MN, Paixão TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.* 2010; 184: 146–155.
 14. Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón JA. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell. Microbiol.* 2004; 6: 435–445.
 15. Castañeda-Roldán EI, Ouahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 2006; 8: 1877–1887.
 16. Castaño-Zubieta MR, Rossetti CA, Maurizio E, Hensel ME, Arenas-Gamboa ÁM. Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR strain in goats. *Vaccine* 2021; 39: 617–625.
 17. Celli J. The Intracellular Life Cycle of *Brucella* spp. *Microbiol. Spectr.* 2019; 7.
 18. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Marta J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 53: 241–256.
 19. Crawford RP, Adams LG, Williams JD. Relationship of fetal age at conjunctival exposure of pregnant heifers and *Brucella abortus* isolation. *Am. J. Vet. Res.* 1987; 48: 755–757.
 20. Czibener C, Merwaiss F, Guaimas F, Del Giudice MG, Serantes DA, Spera JM, Ugalde JE. BigA is a novel adhesin of *Brucella* that mediates adhesion to epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 2016; 18: 500–513.
 21. de Oliveira MM, Pereira CR, de Oliveira IR, Godfroid J, Lage AP, Dorneles EMS. Efficacy of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains: A systematic review and meta-analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022; 69: e32–e51.
 22. del C Rocha-Gracia R, Castañeda-Roldán EI, Gionocerezo S, Girón JA. *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 213: 219–224.
 23. Dorneles EMS, Lima GK, Teixeira-Carvalho A, Araujo MSS, Martins-Filho OA, Sriranganathan N, Al Qublan H, Heinemann MB, Lage AP. Immune Response of Calves Vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and Revaccinated with RB51. *PLoS One* 2015a; 10: e0136696.
 24. Dorneles EMS, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet. Res.* 2015b; 46: 76.
 25. Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG, Enright FM. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. *Vet. Microbiol.* 2002; 90: 425–431.
 26. Enright F. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals, in: Nielsen, K., Duncan (Eds.), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, USA, 1990; pp. 301–320.
 27. Fensterbank R, Verger JM, Grayon M. Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev 1. *Ann. Rech. Vet.* 1987; 18: 397–403.
 28. Fernández AG, Ferrero MC, Hielpos MS, Fossati CA, Baldi PC. Proinflammatory Response of Human Trophoblastic Cells to *Brucella abortus* Infection and upon Interactions with Infected Phagocytes. *Biol. Reprod.* 2016; 94: 48.
 29. Fernández AG, Hielpos MS, Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC. Proinflammatory response of canine

- trophoblasts to *Brucella canis* infection. *PLoS One* 2017; 12: e0186561.
30. Fluegel Dougherty AM, Cornish TE, O'Toole D, Boerger-Fields AM, Henderson OL, Mills KW. Abortion and premature birth in cattle following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. diagnostic Investig.* 2013; 25: 630–635.
 31. García-Méndez KB, Hielpos SM, Soler-Llorens PF, Arce-Gorvel V, Hale C, Gorvel J-P, O'Callaghan D, Keriell A. Infection by *Brucella melitensis* or *Brucella papionis* modifies essential physiological functions of human trophoblasts. *Cell. Microbiol.* 2019; 21: e13019.
 32. Goenka R, Parent MA, Elzer PH, Baldwin CL. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.* 2011; 203: 1136–1146.
 33. Hall SM, Confer AW, Patterson JM. *Brucella abortus*-specific immunoglobulin in isotypes in serum and vaginal mucus from cattle vaccinated with strain 19 and challenge exposed with virulent strain 2308. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 49: 840–846.
 34. Hensel ME, Arenas-Gamboa AM. A Neglected Animal Model for a Neglected Disease: Guinea Pigs and the Search for an Improved Animal Model for Human Brucellosis. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2593.
 35. Hensel ME, Chaki SP, Stranahan L, Gregory AE, van Schaik EJ, Garcia-Gonzalez DG, Khalaf O, Samuel JE, Arenas-Gamboa AM. Intratracheal Inoculation with *Brucella melitensis* in the Pregnant Guinea Pig Is an Improved Model for Reproductive Pathogenesis and Vaccine Studies. *Infect. Immun.* 2020a; 88.
 36. Hensel ME, Garcia-Gonzalez DG, Chaki SP, Hartwig A, Gordy PW, Bowen R, Ficht TA, Arenas-Gamboa AM. Vaccine Candidate *Brucella melitensis* 16MΔvjbR Is Safe in a Pregnant Sheep Model and Confers Protection. *mSphere* 2020b; 5.
 37. Hernández-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Puente JL, Suárez-Güemes F. The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. *Microb. Pathog.* 2008; 44: 28–33.
 38. Hernández-Mora G, Chacón-Díaz C, Moreira-Soto A, Barrantes-Granados O, Suárez-Esquivel M, Viquez-Ruiz E, Barquero-Calvo E, Ruiz-Villalobos N, Chaves-Olarte E, Lomonte B, Guzmán-Verri C, Drexler JF, Moreno E. Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans and wild and domestic animals. *mSphere* 8 2023; e0006123.
 39. Hielpos MS, Ferrero MC, Fernández AG, Falivene J, Vanzulli S, Comerci DJ, Baldi PC. Btp Proteins from *Brucella abortus* modulate the lung innate immune response to infection by the respiratory route. *Front. Immunol.* 2017; 8.
 40. Igwebuike UM. Trophoblast cells of ruminant placentas--A minireview. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 93: 185–198.
 41. Inan A, Erdem H, Elaldi N, Gulsun S, Karahocagil MK, Pekok AU, Ulug M, Tekin R, Bosilkovski M, Ayaslioglu E, Bilgic-Atli S, Erbay A, Ergen, P, Kadanali A, Sahin S, Sahin-Horasan E, Avci A, Cag Y, Beeching NJ. Brucellosis in pregnancy: results of multicenter ID-IRI study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; 38: 1261–1268.
 42. Jář M, Freddi L, Mick V, Durand B, Girault G, Perrot L, Taunay B, Vuilmet T, Azam D, Ponsart C, Zanella G. *Brucella* microti-like prevalence in French farms producing frogs. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; 67: 617–625.
 43. Jiménez-Pelayo L, García-Sánchez M, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Collantes-Fernández E, Gómez-Bautista M, Hambruch N, Pfarrer C, Ortega-Mora LM. Immune response profile of caruncular and trophoblast cell lines infected by high- (Nc-Spain7) and low-virulence (Nc-Spain1H) isolates of *Neospora caninum*. *Parasit. Vectors.* 2019; 12: 218.
 44. Jimenez de Bagues MP, Marin CM, Barberan M, Blasco JM. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann. Rech. Vet.* 1989; 20: 205–213.
 45. Keestra-Gounder AM, Byndloss, MX, Seyffert N, Young BM, Chávez-Arroyo A, Tsai AY, Cevallos SA, Winter MG, Pham, OH, McSorley SJ, Bäumlér AJ, Tsois RM. NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature.* 2016; 532: 394–397.
 46. Kim S, Lee DS, Watanabe K, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M. Interferon-gamma promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 22.
 47. Ledwaba MB, Glover BA, Matle I, Profiti G, Martelli PL, Casadio R, Zilli K, Janowicz A, Marotta F, Garofolo G, van Heerden H. Whole Genome Sequence Analysis of *Brucella abortus* Isolates from Various Regions of South Africa. *Microorganisms* 2021; 9.
 48. Letesson J-J, Barbier T, Zúñiga-Ripa A, Godfroid J, De Bolle X, Moriyón I. *Brucella* Genital Tropism: What's on the Menu. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 506.
 49. Liu X, Zhou M, Wu J, Wang J, Peng Q. HMGB1 release from trophoblasts contributes to inflammation during *Brucella melitensis* infection. *Cell. Microbiol.* 2019; 21: e13080.
 50. Lopez P, Guaimas F, Czibener C, Ugalde JE. A genomic island in *Brucella* involved in the adhesion to host cells: Identification of a new adhesin and a translocation factor. *Cell. Microbiol.* 2020; 22: e13245.
 51. Marchesini MI, Morrone Seijo SM, Guaimas FF, Comerci DJ. A T4SS Effector Targets Host Cell Alpha-Enolase Contributing to *Brucella abortus* Intracellular Lifestyle. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6: 153.
 52. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel J-P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol. Rev.* 2011; 240: 211–234.
 53. Meglia GE, Castillo M, Gomez MB, Tortone C, Cerutti DA, Gastaldo MF, Ardoino S, Palermo P, Belaustegui F, Elena S, Bonastre P, Fabeiro M, Franco C, Bagnat E. La protección contra el aborto por la primovacunación antibrucelica caprina, ante el desafío de la revacunación. *InVet* 2023; 25: 1-11.
 54. Mol JPS, Costa EA, Carvalho AF, Sun Y-H, Tsois RM, Paixão TA, Santos RL. Early transcriptional responses

- of bovine chorioallantoic membrane explants to wild type, Δ virB2 or Δ tpB *Brucella abortus* infection. *PLoS One* 2014; 9: e108606.
55. Mol JPS, Pires SF, Chapeaurouge AD, Perales J, Santos RL, Andrade HM, Lage AP. Proteomic Profile of *Brucella abortus*-Infected Bovine Chorioallantoic Membrane Explants. *PLoS One* 2016; 11: e0154209.
 56. Montaraz JA, Winter AJ, Hunter DM, Sowa BA, Wu AM, Adams LG. Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1986; 51: 961–963.
 57. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 3569–3576.
 58. Olsen SC, Johnson C. Comparison of abortion and infection after experimental challenge of pregnant bison and cattle with *Brucella abortus* strain 2308. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18: 2075–2078.
 59. Palmer M V, Elsasser TH, Cheville NF. Tumor necrosis factor-alpha in pregnant cattle after intravenous or subcutaneous vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 1998; 59: 153–156.
 60. Pastor-Fernández I, Collantes-Fernández E, Jiménez-Pelayo L, Ortega-Mora LM, Horcajo P. Modeling the Ruminant Placenta-Pathogen Interactions in Apicomplexan Parasites: Current and Future Perspectives. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 634458.
 61. Petersen E, Rajashekara G, Sanakkayala N, Eskra L, Harms J, Splitter G. Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*. *Microbes Infect.* 2013; 15: 440–449.
 62. Posadas DM, Ruiz-Ranwez V, Bonomi HR, Martín FA, Zorreguieta A. BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cell. Microbiol.* 2012; 14: 965–982.
 63. Ren J, Hou H, Zhao W, Wang J, Peng Q. Administration of Exogenous Progesterone Protects Against *Brucella abortus* Infection-Induced Inflammation in Pregnant Mice. *J. Infect. Dis.* 2021; 224: 532–543.
 64. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm. Behav.* 2012; 62: 263–271.
 65. Rodríguez MC, Viadas C, Seoane A, Sangari FJ, López-Goñi I, García-Lobo JM. Evaluation of the effects of erythritol on gene expression in *Brucella abortus*. *PLoS One* 2012; 7: e50876.
 66. Roop RM 2nd, Barton IS, Hoppersberger D, Martin DW. Uncovering the Hidden Credentials of *Brucella* Virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021; 85.
 67. Roop RM 2nd, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol. Microbiol.* 2004; 52: 621–630.
 68. Rossetti CA, Drake KL, Adams LG. Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: A molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2012; 14.
 69. Rossetti CA, Maurizio E, Rossi UA. Comparative Review of Brucellosis in Small Domestic Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9: 887671.
 70. Ruiz-Ranwez V, Posadas DM, Estein SM, Abdian PL, Martín FA, Zorreguieta A. The BtaF trimeric autotransporter of *Brucella suis* is involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence. *PLoS One.* 2013a; 8: e79770.
 71. Ruiz-Ranwez V, Posadas DM, Van der Henst C, Estein SM, Arocena GM, Abdian PL, Martín FA, Sieira R, De Bolle X, Zorreguieta A. BtaE, an adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of *Brucella suis*. *Infect. Immun.* 2013b; 81: 996–1007.
 72. Salcedo SP, Chevrier N, Lacerda TLS, Ben Amara A, Gerart S, Gorvel VA, de Chastellier C, Blasco JM, Mege J-L, Gorvel J-P. Pathogenic *brucellae* replicate in human trophoblasts. *J. Infect. Dis.* 2013; 207: 1075–1083.
 73. Samartino LE, Enright FM. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53: 359–363.
 74. Samartino LE, Enright FM. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 16: 95–101.
 75. Samartino LE, Enright FM. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 19: 55–63.
 76. Sidhu-Muñoz RS, Sancho P, Vizcaíno N. Evaluation of human trophoblasts and ovine testis cell lines for the study of the intracellular pathogen *Brucella ovis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018; 365.
 77. Silberstein E, Kim KS, Acosta D, Debrabant A. Human Placental Trophoblasts Are Resistant to *Trypanosoma cruzi* Infection in a 3D-Culture Model of the Maternal-Fetal Interface. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 626370.
 78. Skendros P, Boura P. Immunity to brucellosis. *Rev. Sci. Tech.* 2013; 32: 137–147.
 79. Smith H, Williams AE, Pearce JH, Keppie J, Harris-Smith PW, Fitz-George RB, Witt K. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature.* 1962; 193: 47–49.
 80. Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A, Langwisch S, Schulte-Wrede U, Teles A, Paeschke S, Volk H-D, Zenclussen AC. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 58: 514–523.
 81. Tsai AY, Byndloss MX, Seyffert N, Winter MG, Young BM, Tsois RM. Tumor Necrosis Factor Alpha Contributes to Inflammatory Pathology in the Placenta during *Brucella abortus* Infection. *Infect. Immun.* 2022; 90: e0001322.
 82. Vitry M-A, Hanot Mambres D, Deghelt M, Hack K, Machelart A, Lhomme F, Vanderwinden J-M, Vermeersch M, De Trez C, Pérez-Morga D, Letesson J-J, Muraille E. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect. Immun.* 2014; 82: 3927–3938.

83. von Schönfeldt V, Rogenhofer N, Ruf K, Thaler CJ, Jeschke U. Sera of patients with recurrent miscarriages containing anti-trophoblast antibodies (ATAB) reduce hCG and progesterone production in trophoblast cells in vitro. *J. Reprod. Immunol.* 2016; 117: 52–56.
84. Wang X, Lin P, Li Y, Xiang C, Yin Y, Chen Z, Du Y, Zhou D, Jin Y, Wang A. *Brucella suis* Vaccine Strain 2 Induces Endoplasmic Reticulum Stress that Affects Intracellular Replication in Goat Trophoblast Cells In vitro. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6: 19.
85. Wang Z, Wang SS, Wang GL, Wu TL, Lv Y, Wu QM. A pregnant mouse model for the vertical transmission of *Brucella melitensis*. *Vet. J.* 2014; 200: 116–121.
86. Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, Watarai M. Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 212.
87. Wheelhouse N, Wattedegera S, Stanton J, Maley S, Watson D, Jepson C, Deane D, Buxton, D, Longbottom D, Baszler T, Entrican G. Ovine trophoblast is a primary source of TNFalpha during *Chlamydomphila abortus* infection. *J. Reprod. Immunol.* 2009; 80: 49–56.
88. Xavier MN, Paixao TA, Poester EP, Lage AP, Santos RL. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Path.* 2009; 140: 149-157.
89. Zhang H, Dou X, Li Z, Zhang Y, Zhang J, Guo F, Wang Y, Wang Z, Li T, Gu X, Chen C. Expression and regulation of the ery operon of *Brucella melitensis* in human trophoblast cells. *Exp. Ther. Med.* 2016; 12: 2723–2728.
90. Zhang J, Li M, Li Z, Shi J, Zhang Y, Deng X, Liu L, Wang Z, Qi Y, Zhang H. Deletion of the Type IV Secretion System Effector VceA Promotes Autophagy and Inhibits Apoptosis in *Brucella*-Infected Human Trophoblast Cells. *Curr. Microbiol.* 2019; 76: 510–519.
91. Zriba S, Garcia-Gonzalez DG, Khalaf OH, Wheeler L, Chaki SP, Rice-Ficht A, Ficht TA, Arenas-Gamboa AM. Vaccine safety studies of *Brucella abortus* S19 and S19DeltavjbR in pregnant swine. *Vaccine X.* 2019; 3: 100041.