

JUNNIA LUISA PENA

INTERAÇÃO ENTRE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* E AS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA, *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae*, EM LINHAGEM DE CÉLULAS EPITELIAIS MAMÁRIA BOVINA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P397i
2019
Pena, Junnia Luísa, 1987-
Interação entre *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis e as bactérias causadoras de mastite bovina,
Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae*, em linhagem
de células epiteliais mamária bovina / Junnia Luísa Pena. –
Viçosa, MG, 2019.
xiii, 33 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 27-33.

1. Bovinos - Doenças. 2. Mastite. 3. Coinfecção. 4. Células
epiteliais. 5. Glândulas mamárias. 6. *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis*. 7. Paratuberculose. 8. Reação em cadeia
de polimerase. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

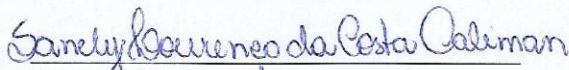
CDD 22. ed. 636.2089

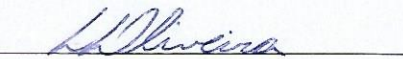
JUNNIA LUISA PENA

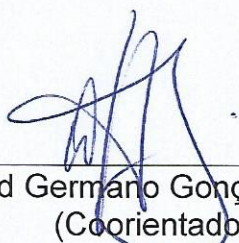
INTERAÇÃO ENTRE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* E AS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA, *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae*, EM LINHAGEM DE CÉLULAS EPITELIAIS MAMÁRIA BOVINA

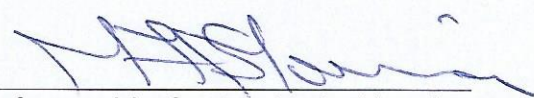
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2019.


Sanely Lourenço da Costa Caliman


Leandro Licursi de Oliveira


David Germano Gonçalves Schwarz
(Coorientador)


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

A minha amada avó, Dalva Ferraz Viana (in memoriam).

“Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça; digo o que penso com esperança; penso no que faço com fé; faço o que tenho que fazer com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende! Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida que o mais importante é o decidir.” Anna Lins dos Guimarães Peixoto Bretas “Cora Coralina” (1889-1985).

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pelo equilíbrio espiritual, me capacitando positivamente para que eu pudesse concluir esta etapa.

A minha avó Dalva (*in memoriam*) agradeço pelo incentivo, sendo minha referência diária, me guiando e orientando espiritualmente.

Aos meus familiares, em especial José Geraldo, Roseli, Aurora, Raul, e meus animais de estimação Amelie (*in memoriam*), Mia, Ariel, Maya e Amora, agradeço pelo apoio, amor e dedicação incondicional, principalmente por compreenderem minha ausência.

À Professora, orientadora e amiga Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, agradeço pela orientação, dedicação, doação e carinho, por fazer parte do meu treinamento profissional e pessoal, extraíndo sempre o melhor de mim, a quem deixo expressa minha gratidão e admiração.

Ao Professor, coorientador e amigo David Germano Gonçalves Schwarz, agradeço pela amizade, orientação e dedicação durante a realização deste trabalho, estando sendo presente, sendo minha referência e inspiração de intelecto e sucesso, deixando expressa minha gratidão e admiração.

Ao Professor Arthur, agradeço pela contribuição intelectual, pelo apoio, carinho e dedicação durante realização da estatística dos resultados deste trabalho, sendo de extrema importância para conclusão da dissertação.

Ao Professor Leandro Licursi de Oliveira agradeço pela contribuição intelectual e apoio durante e realização deste trabalho, sempre nos recebendo com muito carinho e nos esclarecendo dúvidas quando necessário.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Doenças Bacterianas – LDBAC – UFV, em especial Isis, Jessica, Mariana, Magna, Raquel, Richard, Samuel, Sanely e Thaís, agradeço pela amizade e pelas experiências cotidianas compartilhadas.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Veterinária – UFV, em especial à Rosinéia, agradeço pela amizade e dedicação, pela excelência como profissional e pelo ser humano fantástico que você é, sempre zelando por todos os pós-graduandos, fazendo tudo com muito carinho e amor, a você Rosi, expresso minha gratidão e admiração.

Aos técnicos e amigos dos laboratórios do DVT – UFV, em especial Sr. Luis Carlos, Batalha, Sr. Divino, Marquinhos, Nívia, Dagoberto, Hécio e Alex, agradeço pela amizade, apoio, colaboração que foram de extrema importância para realização deste trabalho.

A todos meus amigos, desde os mais antigos aos mais recentes, da Escola Estadual Laudelina Barandier Esmeraldo, do Colégio Municipal Rio Branco, da graduação de Zootecnia – IFET e graduação em Medicina Veterinária – Univiçosa, da pós-graduação DVT – UFV, e todos aqueles que estiveram presentes durante esta etapa, especialmente à Bruna Torres, Caroline Freitas, Dailli Lima, Everton Cruz, Hallef Rieger, Isis Espescht, Jenniffer Hauschildt, Milimani Andretta, Valéria Cavicchioli e Viviane Assao, agradeço pelo apoio diário e por tornarem minha caminhada mais alegre, compartilhando momentos inesquecíveis.

A CAPES agradeço pelo apoio financeiro.

A UFV, em especial ao Departamento de Veterinária, agradeço pela minha formação e treinamento, principalmente pelas oportunidades e experiências proporcionadas.

BIOGRAFIA

Junnia Luísa Pena, filha de José Geraldo Pena e Roseli Aparecida Batista, nasceu em Visconde do Rio Branco – MG, em 08 de junho de 1987.

Em fevereiro de 2012 iniciou os estudos no curso superior em Zootecnia no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, graduando-se em fevereiro de 2017.

Em março de 2017 iniciou os estudos do mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Em fevereiro de 2019 submeteu-se à defesa de dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVEATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo Geral.....	11
3.2 Objetivos Específicos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Isolados bacterianos e cultura.....	12
4.1.1 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	12
4.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	12
4.2 Células epiteliais mamárias e condições de cultura.....	13
4.3 Ensaio de internalização bacteriana.....	13
4.4 PCR quantitativa em tempo real absoluta – qPCR	14
4.5 Viabilidade das células MAC-T.....	14
4.6 Análise estatística.....	15
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	26
8. PERSPECTIVAS.....	26
9. REFERÊNCIAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Comparação entre os tratamentos dos ensaios de internalização bacteriana em células MAC-T, previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e co-infectadas separadamente com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* realizados nos tempos 10, 30 e 120 minutos..... 18
- Figura 2.** Comparação entre os tratamentos submetidos ao ensaio de MTT, após ensaio de internalização em células MAC-T previamente infectadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), sendo a co-infecção realizada por *Staphylococcus aureus*, no tempo 120 minutos..... 19
- Figura 3.** Comparação entre os tratamentos submetidos ao ensaio de MTT, após ensaio de internalização em células MAC-T previamente infectadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), sendo a co-infecção realizada por *Streptococcus agalactiae*, no tempo 120 minutos..... 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média dos valores da relação entre a densidade óptica (OD) e crescimento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> , isolados de mastite bovina.....	16
Tabela 2. Valores médios de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), referentes aos ensaios de internalização bacteriana realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP), e co-infectadas por <i>Staphylococcus aureus</i> isolado de mastite bovina.....	17
Tabela 3. Valores médios de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), referentes aos ensaios de internalização bacteriana realizados em células células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP), e co-infectadas por <i>Streptococcus agalactiae</i> isolado de mastite bovina.....	17
Tabela 4. Valores médios expressos em cópias genômicas de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP), obtidos por qPCR das amostras dos ensaios de internalização, previamente infectadas com MAP, e co-infectadas separadamente por <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
Tabela 5. Valores médios de absorvância (550nm) dos ensaios de internalização realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP), co-infectadas por <i>Staphylococcus aureus</i> , submetidas ao teste de MTT (brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio).....	20
Tabela 6. Valores médios de absorvância (550nm) dos ensaios de internalização realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP), co-infectadas por <i>Streptococcus agalactiae</i> , submetidas ao teste de MTT (brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio).....	21

LISTA DE ABREVEATURAS

ATP – adenosina trifosfato

BAAR – bacilo álcool ácido resistente

BHI – meio de infusão de cérebro e coração

BIOMOL – Laboratório de Biologia Molecular

CBT – contagem bacteriana total

CCS – contagem de células somáticas

CO₂ – dióxido de carbono

DC – Doença de Crohn

DMEM – meio de eagle modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

FAPs – proteínas de ligação à fibronectina

FBS – soro fetal bovino

FN – fibronectinas

IFN- γ – interferón gama

IL – interleucina

LDBAC – Laboratório de Doenças Bacterianas

MAC-T – célula epiteliais da glândula mamária bovina

MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAPK – proteínas quinases ativadas por mitogênio

MB – meio Middlebrook

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

ml – mililitro

nm – nanômetro

OADC – catalisador de dextrose de ácido oleico

OD – densidade óptica

PBS – tampão fosfato salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

PRRs – receptores de reconhecimento padrão

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*

SapM – secreção de fosfatase ácida

TLRs – receptores Toll-like

UFC – unidade formadora de colônias

RESUMO

PENA, Junnia Luísa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Interação entre *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e as bactérias causadoras de mastite bovina, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, em linhagem de células epiteliais da glândula mamária bovina.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior e David Germano Gonçalves Schwarz.

O estudo do agente etiológico da paratuberculose em ruminantes, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), tem ganhado expressiva importância no cenário científico nas últimas décadas. Contudo, ainda existe uma carência significativa em relação ao conhecimento do comprometimento de determinados órgãos acometidos. Dentre esses, seu papel na glândula mamária ainda é incompreendido, embora suspeita-se que MAP não tenha relação direta com a mastite, mesmo sendo eliminado no leite, a qual é a 2ª via de eliminação desta bactéria. Neste estudo, foi avaliada a influência de MAP em cocultura com as principais bactérias causadoras de mastite bovina, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, em células epiteliais mamárias (MAC-T) em diferentes tempos. Foram realizados ensaios de internalização bacteriana, contagem de colônias, ensaios moleculares e avaliação da viabilidade das células MAC-Ts. Os resultados demonstraram que a presença de MAP dentro das células MAC-T, confirmada pelos ensaios moleculares de qPCR, não favoreceu a internalização de *S. agalactiae*, mas favoreceu a internalização de *S. aureus* significativamente no tempo 30 minutos. Os ensaios de viabilidade celular realizados pelo teste de MTT (brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio), confirmaram que durante os ensaios de internalização, as células MAC-T se apresentaram viáveis, evidenciando que o processo de internalização não foi influenciado pela morte celular e sim pela presença de MAP, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Esses resultados confirmam a existência da interação entre MAP e os agentes clássicos causadores da mastite bovina *S. aureus* e *S. agalactiae*, favorecendo internalização de *S. aureus* e não influenciando a invasão de *S. agalactiae* durante os ensaios de internalização bacteriana em células da glândula mamária bovina – MAC-T.

ABSTRACT

PENA, Junnia Luísa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and those causing bovine mastitis, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, in bovine mammary gland epithelial cell line.** Advisor: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior and David Germano Gonçalves Schwarz.

The study of the etiological agent of paratuberculosis in ruminants, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), has gained significant importance in the scientific scenario in recent decades. However, there is still a significant lack in relation to the knowledge of the involvement of certain affected organs. Among these, its role in the mammary gland is still misunderstood, although it is suspected that MAP is not directly related to mastitis, even though it is eliminated in milk, which is the second route of elimination of this bacterium. In this study, the influence of MAP on coculture with the main bacteria causing bovine mastitis, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, on mammary epithelial cells (MAC-T) at different times was evaluated. Bacterial internalization, colony counts, molecular assays and viability evaluation of MAC-Ts cells were performed. The results demonstrated that the presence of MAP within the MAC-T cells, confirmed by the molecular assays of qPCR, did not favor the internalization of *S. agalactiae*, but favored the internalization of *S. aureus* significantly in the time 30 minutes. Cell viability assays performed by the MTT test (3 - [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) confirmed that during the internalization assays, were found to be viable, evidencing that the internalization process was not influenced by cell death but by the presence of MAP, *S. aureus* and *S. agalactiae*. These results confirm the existence of the interaction between MAP and the classic causative agents of bovine mastitis *S. aureus* and *S. agalactiae*, favoring the internalization of *S. aureus* and not influencing the invasion of *S. agalactiae* during the bacterial internalization tests in cells of the gland bovine mammary - MAC-T.

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é responsável pelo insucesso econômico nas fazendas leiteiras, comprometendo a sanidade e o bem estar dos animais, bem como a qualidade do leite. Esta enfermidade pode estar correlacionada com a paratuberculose, visto que a segunda maior via de eliminação do seu agente etiológico, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), é o leite, sendo esta enfermidade caracterizada por uma enterite granulomatosa crônica incurável, que acomete principalmente os ruminantes, responsável por grandes perdas econômicas na cadeia produtiva.

As interações entre MAP e os agentes clássicos causadores da mastite bovina ainda são pouco compreendidas, podendo estar contribuindo para o desenvolvimento e a persistência da mastite nos rebanhos. O tratamento tradicional da mastite consiste primeiramente em realizar o isolamento, a identificação e o antibiograma para os agentes causadores desta enfermidade, e assim a utilização dos antibióticos. Porém os resultados nem sempre são satisfatórios, e na maioria das vezes ocorre uso indiscriminado de antibióticos, que podem contribuir para resistência antimicrobiana. Desta forma, destaca-se a importância sobre a investigação do tipo e da natureza patogênica de espécies bacterianas relacionadas à mastite, desenvolvendo tratamentos efetivos e ações preventivas eficazes.

Em 1993, um estudo realizado em bovinos por Wilson et al., descobriram que novos casos de mastite subclínica e crônica eram menores em bovinos portadores de paratuberculose subclínica, sendo detectadas por análises microbiológicas de leite e por cultura fecal respectivamente, demonstrando uma possível associação e interação entre os agentes desta enfermidade.

Considerando a ausência de estudos e as crescentes implicações econômicas da paratuberculose e mastite bovina, o objetivo deste trabalho foi determinar a interação entre MAP e os agentes clássicos causadores de mastite bovina *S. aureus* e *S. agalactiae* em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T), em condições experimentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, é um bacilo Gram-positivo, aeróbico, não formador de esporos, não-móvel, álcool ácido resistente (BAAR), que possui uma parede celular complexa, relativamente impermeável, composta por lipídios e peptídeos, incluindo os ácidos micólicos que são característicos da família *Mycobacteriaceae*, sendo melhor corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (Timms et al., 2011).

A presença desta parede celular aumenta a resistência do MAP a diversos valores de pH, produtos químicos e calor, e promove a sua sobrevivência no ambiente, e em contrapartida restringe a absorção de nutrientes, fazendo com que seu crescimento seja lento, mesmo em condições ideais, dificultando a cultura em laboratório (Marino et al., 2017).

A paratuberculose bovina é uma doença infecciosa bacteriana crônica de distribuição mundial, também conhecida como doença de Johne, causada pelo agente etiológico *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de enterite granulomatosa crônica, perda de peso progressiva, diarreia crônica, desidratação e morte, sendo considerada de significativo impacto econômico devido às perdas na produção animal (Lombard et al., 2005; McKenna et al., 2006; Smith et al., 2009; Kudahl e Nielsen, 2009; Marino et al., 2017; Sallam et al., 2018).

O desenvolvimento da paratuberculose é classificado em três fases, onde a fase I é subclínica, sem eliminação do agente, e o processo infeccioso se desenvolve sem que haja a eliminação da bactéria; a fase II é classificada como subclínica excretora, durante a qual a concentração de MAP na mucosa intestinal e no lúmen intestinal aumentam progressivamente; já a fase III, é a manifestação clínica e excretora da doença, caracterizada por diarreia crônica e pelo aparecimento dos sintomas de um processo infeccioso generalizado (Cocito et al., 1994; Buerquelt et al., 2000).

Alguns estudos sugerem uma possível associação entre MAP e a doença de Crohn (DC), que é caracterizada por um distúrbio gastrointestinal crônico em humanos, onde esta possível associação tem sido o foco de pesquisa há muitos anos devido às semelhanças na patogênese da doença de Crohn com a doença de

Johne (Mendonza et al., 2009, Pierce et al. 2009, Schwalm et al., 2018), e pelo fato que o leite e produtos lácteos poderiam ser a principal fonte de contaminação para os humanos.

Embora no Brasil não existam programas de controle e erradicação da paratuberculose, esta enfermidade é uma doença de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial, que requer notificação imediata de qualquer caso confirmado, conforme descrito na Instrução Normativa MAPA nº 50, de 23 de setembro de 2013.

Apesar da ocorrência da doença e da detecção do agente no Brasil em rebanhos de bovinos, búfalos, cabras, ovelhas, e em leite cru e pasteurizado (Carvalho et al., 2009; Carvalho et al., 2012), sabe-se que os métodos para estimar a prevalência da paratuberculose diferem entre estados, prejudicando a avaliação total de rebanhos nacionais.

Há dificuldades em detectar a paratuberculose em animais infectados que não apresentam os sinais de doença, mas uma vez detectada deve ser comunicada ao OIE (*World Organisation for Animal Health*), conforme indicado no seu Código Sanitário para os Animais Terrestres. A cultura fecal, embora tecnicamente difícil e demorada, detecta animais infectados acima de seis meses ou mais, antes de desenvolverem sinais clínicos, o que é muito importante, uma vez que esta doença tem uma progressão lenta e muitos animais são assintomáticos (OIE, 2019).

Internacionalmente, a paratuberculose causa danos consideráveis ao comércio, resultantes da limitação do comércio de animais de produção infectados (Marino et al., 2017). Essas perdas contribuíram para que países desenvolvidos adotassem a implementação de programas de controle e erradicação da paratuberculose, já os países em desenvolvimento ainda não possuem essa mesma prioridade preventiva em seus rebanhos (Schwarz et al., 2012).

Embora a paratuberculose seja mais evidente no trato gastrointestinal e linfonodos mesentéricos, a contaminação pode ser disseminada para outros locais extra-intestinais, como na glândula mamária, sendo MAP isolado no leite (Sweeney, 1997), considerado segunda via de eliminação deste agente em fase III da doença. Mesmo que exista uma possibilidade de transmissão vertical, a principal forma de transmissão é horizontal, onde leite e o contato de úberes e tetos sujos com fezes de animais afetados podem contaminar os bezerros durante a lactação (Sweeney et al., 1997; Clarke et al., 2008; Doré et al., 2012).

Os animais mais jovens são os mais susceptíveis, em média nos primeiros seis meses de vida (Windsor e Whittington, 2010), ainda não tendo esclarecimentos sobre o porquê dos estágios iniciais da vida serem os mais importantes para a contaminação, podendo haver ligação com imaturidade do sistema imune inato e ou adaptativo, e pela capacidade de absorção intestinal de macromoléculas intactas em animais jovens poderiam ser cruciais para a suscetibilidade (Sweeney 2011). Essa suscetibilidade precoce à contaminação também pode estar relacionada à capacidade limitada de animais jovens de controlar patógenos intracelulares, enquanto os bovinos adultos parecem ser refratários à infecção (Marino et al., 2017).

O grau de detecção de MAP nas fezes pode estar relacionado a outros fatores, principalmente com a quantidade de MAP ingerida, que atingirá o intestino de animais susceptíveis, onde o epitélio intestinal serve como a primeira barreira defensiva contra o microrganismo, principalmente por mecanismos inatos como glicocálix, junções celulares e peptídeos antimicrobianos (Bannantine e Bermúdez 2013).

No entanto, MAP tem a capacidade de ignorar essas defesas e causar infecção passando por dois tipos de células: M (células microfold) e enterócitos. A entrada de MAP nas células M depende da ligação entre fibronectinas (FN) e proteínas de ligação à fibronectina (FAPs) expressas pelo microrganismo.

Sendo assim, a predileção de MAP para células M está principalmente relacionada à ligação por um mecanismo dependente de FN e, subsequentemente, os FN-opsonizados se ligam a integrinas $\beta 1$ presentes na superfície luminal de células M (Byrd et al., 1993; Secott et Al., 2004).

O bloqueio das subunidades de integrina revelou uma diminuição da invasão de MAP nas células M, indicando a importância seletiva da subunidade $\beta 1$ e o envolvimento da integrina $\alpha V\beta 3$ neste processo (Secott et al., 2004). Um estudo desenvolvido por Bermudez et al., (2010), relatou que ao usar o anticorpo IgG anti- $\alpha 5 \beta 1$ de camundongos, observou-se uma redução de 37,3% na entrada de MAP nas células, mostrando que o microrganismo ativou outras vias, além de dependentes de FN para internalização.

MAP possui um comportamento importante para sua manutenção nas células, pois quando se internaliza, existe uma supressão rápida das vias de comunicação celular que incluem junções de comunicação, junções de fendas e junções aderentes, formando um complexo de junção intercelular capaz de estabelecer

maior resistência à infecção, mas quando há uma diminuição na expressão de genes relacionados a esta via, reduz a eficácia da barreira imune local (Khare et al., 2012).

O mecanismo pelo qual MAP evade as células epiteliais ainda não está claramente descrito, mas é sabido que dentro das células M, MAP é facilmente deslocado para a região basal e capturado por células dendríticas ou macrófagos. Por outro lado, quando dentro dos enterócitos, MAP parece estimular as proteínas Gdtas Cdc42 e RhoA que promovem o tráfego de MAP ao interior dos endossomas, onde se acidifica. Este processo é crucial para a rápida produção de IL-1 β , atraindo macrófagos subepiteliais e infectando-os de forma mais eficiente (Lamont et al., 2012; Bannantine e Bermúdez 2013).

Patel et al. (2006) descobriram que a eficiência da invasão nas células epiteliais bovinas foi maior quando MAP foi previamente incubado no leite ou quando já foi passada através de células epiteliais mamárias, demonstrando que existem outros fatores que contribuem para a maior disseminação do agente para os macrófagos subepiteliais.

MAP pode invadir macrófagos por caminhos diferentes, acoplando-se a receptores distintos, sejam receptores do complemento, receptores de imunoglobulina, manose e eliminador, levando a diferentes estímulos do sistema imunológico (Guirado et al., 2013). No interior dos macrófagos, MAP é capaz de prevenir a maturação e acidificação de fagossomas, bem como a formação de fagolissomos, responsáveis pela atividade de catabolização de componentes estrangeiros, pois MAP pode estimular a produção de fosfatase lipídica SapM, eliminando fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) da membrana de fagossoma e prevenindo sua maturação (Vergne et al., 2005).

As interações entre MAP e os agentes clássicos causadores da mastite bovina ainda são pouco compreendidas, podendo estar contribuindo para o desenvolvimento e a persistência da mastite nos rebanhos. A mastite bovina é uma inflamação na glândula mamária que afeta a sanidade dos bovinos, sendo classificada de forma aguda ou crônica diante do seu curso de duração, de forma clínica ou subclínica diante da intensidade dos seus sintomas e sinais e epidemiologicamente dividida em contagiosa ou ambiental (Barros, 2016).

É considerada como a principal causa de perdas econômicas na indústria de laticínios em todo o mundo, principalmente devido a uma diminuição na quantidade

e na qualidade do leite, bem como pelos gastos com tratamento, com o uso de antimicrobianos e descarte do leite das vacas tratadas durante o período de carência (Cheng et al., 2019).

Streptococcus agalactiae e *Staphylococcus aureus* são considerados originalmente como patógenos de mastite contagiosa, no entanto, ambos os patógenos foram recentemente isolados de locais extramamários e ambientais, indicando que outros locais além do úbere podem contribuir para a disseminação desses patógenos potencialmente causando infecções intramamárias (Svennesen et al., 2018).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, sendo a maioria das suas estirpes coagulase-positiva, podendo ser encontrada na pele do úbere, nas amígdalas, no trato urogenital baixo, e no trato respiratório superior, dos animais e nas mãos do ordenhador, bem como nas camas e reservatórios de água, sendo o úbere sua maior fonte de infecção, onde a transmissão ocorre, principalmente, durante a ordenha, pelas mãos dos ordenhadores e por teteiras contaminadas (Radostits et al., 2002; Andrews et al., 2008; Quinn et al., 2011).

A maioria das infecções por *S. aureus* é crônica, subclínica e com elevadas contagem de células somáticas (CCS), tendo por vezes períodos de infecção clínica que pode ser suave ou até mesmo gangrenosa. *S. aureus* adere às células epiteliais da glândula mamária, invadindo-as e passando assim para o tecido intersticial, sendo resistentes à fagocitose pelos neutrófilos e danificam as células mamárias, podendo levar a fibrose e formação de abscessos. O tratamento por antibioterapia é difícil, uma vez que desenvolvem mecanismos de resistência ou por uso inadequado, pois durante a inflamação o antibiótico não penetra em abscessos, não alcançando *S. aureus* intracelular (Smith, 2009).

A aderência à superfície celular pode permitir que *S. aureus* invada as células epiteliais, instalando-se em partes mais profundas da glândula mamária (Hensen et al., 2000). Este potencial invasivo é um importante fator de virulência relacionado à mastite, permitindo que o microrganismo sobreviva e se multiplique dentro das células epiteliais, e assim ser protegido dos mecanismos de defesa do hospedeiro e ação do agente antimicrobiano, podendo persistir no hospedeiro por um longo período sem causar inflamação aparente (Alva-Murillo et al., 2012; Bardiau et al., 2014).

Streptococcus agalactiae são cocos Gram-positivos, catalase negativos, que sobrevivem durante pouco tempo no ambiente, mas que pode persistir na glândula mamária por longos períodos, sendo a maior fonte de infecção do úbere de vacas infectadas, bem como em ambiente contaminado, que também irá contribuir na propagação (Aires, 2010).

A bactéria *S. agalactiae* está frequentemente associada à mastite subclínica e é o patógeno que mais contribui para a elevação da CCS e contagem bacteriana total (CBT) no leite, sendo considerado como um dos principais agentes responsáveis pela redução da produção e da qualidade do leite, além do risco de disseminação desse agente para outros animais do rebanho (Brito et al., 1999).

A capacidade de *S. agalactiae* de causar doença depende da produção de numerosos fatores de virulência, incluindo polissacarídeo, os antígenos alfa e beta da proteína C, proteína de superfície *Rib*, hialuronato liase e peptidase C5a que realizam a mediação da ligação à fibronectina e contribui para a invasão das células epiteliais, sendo codificadas pelos genes *cps*, *bca*, *bac*, *rib*, *hly* e *scpB*, respectivamente (Emaneini et al., 2016).

A resposta imune inata é fundamental para o controle da proliferação de microrganismos e para a erradicação de patógenos que invadem a glândula mamária, e está intimamente relacionada com a resposta imune adquirida, sendo importante para estabelecer um componente de memória característico (Oviedo-Boyso et al. 2007). A glândula mamária contém fatores bacteriostáticos inespecíficos que podem atuar independentemente ou em associação com imunoglobulina (Ig). Um desses fatores é a lactoferrina produzida pelas células epiteliais, macrófagos e neutrófilos, que liga íons de ferro livres presentes no leite, tornando-os indisponíveis para bactérias que precisam deste metal como um fator de crescimento ou uma fonte de ferro, e serve como fonte de ferro para *S. agalactiae* (Sordillo et al., 2002).

O fracasso frequente do tratamento por antibióticos para combater infecções bacterianas e recorrência dessas infecções podem estar relacionadas, entre vários fatores, a capacidade de *S. aureus* de invadir e sobreviver dentro de uma ampla variedade de células eucarióticas, tais como células epiteliais glândula mamária ou células imunes (Beccaria et al., 2018).

O tratamento tradicional para a mastite bovina visa realizar o isolamento, a identificação e o antibiograma para o agente causador desta enfermidade. A não adoção destas etapas geram tratamentos falhos, que estão diretamente ligados

resistência aos antimicrobianos, levando à persistência dos patógenos, causando a recidiva da mastite. Estudos do microbioma do leite demonstram a presença de grande diversidade de agentes na microbiota, evidenciando que agentes “secundários” possam estar contribuindo para o desenvolvimento da mastite, e não somente os agentes clássicos que são facilmente de isolar.

A presença de MAP nas células epiteliais mamárias é considerada uma fase de transição até que os macrófagos sejam recrutados para a infecção local onde o MAP poderá infectá-los (Lamont et al., 2012), e desta forma as células epiteliais mamárias podem ser um potencial reservatório de MAP para animais susceptíveis.

Patel et al., (2006) relataram que dentro das células da glândula mamária, MAP é encontrado dentro de vacúolos citoplasmáticos, observados de forma similar quando infectados em macrófagos, sendo este um mecanismo que desativa os sistemas de defesas dos macrófagos, permitindo a sobrevivência e multiplicação de MAP em seu interior. MAP pode também invadir linhagens de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) tanto pela via apical quanto pela via basolateral com eficiência similar, podendo se translocar em células mamárias, tanto através das vias ascendentes como sistêmicas.

Um estudo de Lamont et al., (2012) realizando cocultura de células MAC-T e macrófagos derivados de monócitos bovinos, demonstrou que MAP usa um mecanismo diferente de outras micobactérias, sendo dependente de cálcio extracelular para a acidificação de fagossomas e produção de IL-1 β , que são fatores do hospedeiro necessários para a translocação bacteriana para macrófagos.

Schwarz et al., (2015), estabeleceram um parâmetro de detecção de DNA de MAP em órgãos de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados pela via intraperitoneal, e avaliou a contribuição desses órgãos na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias durante a infecção por MAP, relatando que após sessenta dias após a infecção foi possível detectar a expressão IFN- γ pelo baço e fígado, bem como TNF- α e IL-4 pelo íleo.

A mastite pode induzir uma resposta local, nos quartos da glândula mamária não infectados que reagem ao quartos infectados (Jensen et al., 2013), bem como uma resposta sistêmica, incluindo alterações no perfil transcricional de órgãos distantes, como o fígado, que podem responder liberando proteínas de fase aguda na corrente sanguínea (Jiang et al., 2008).

Proteínas Quinases Ativadas por Mitogênio (MAPK) são ativadas por estresse quinases que são ativadas pela sinalização TLR-2, onde MAPK-p38 desempenha um importante papel na supressão da resposta antimicrobiana em macrófagos (Weiss et al., 2008), realizando a indução da produção de uma citocina anti-inflamatória, IL-10, e assim MAPK-p38 e IL-10 agem para suprimir a resposta antimicrobiana e resposta imune, levando à persistência de MAP dentro de macrófagos (Souza et al., 2006; Bannantine et al., 2015).

Pelo fato da resposta celular à infecção levar em consideração o tipo de microrganismo patogênico e o tipo de célula desafiada, nas células epiteliais mamárias, MAP pode usar a acidificação dos fagossomas e a produção de IL1 β como estratégias para quimiotratamento de macrófagos, permitindo a translocação do lado da mucosa para as superfícies basais para estabelecer infecção (Lamont et al., 2012). Dentro de macrófagos, MAP tem a capacidade de prevenir a acidificação de fagossomos por inibição da ativação do vacuolar H⁺ -ATPase (Arsenault et al., 2014), bem como ativar vias de sinalização capazes de produzir citocinas que modulam a resposta imune, depois da ligação de membrana pelo receptor Toll-like (TLR)-2.

Independentemente da via de infecção mamária, foi descrito por Schwarz et. al. (2018), a hipótese de que a infecção prévia por *E. coli* em células epiteliais mamárias de bovinos, podem facilitar translocação do MAP subepitelial, em membrana basal ou sistêmica, para a região de mucosa, sendo liberada no leite pela célula com maior eficiência.

Um estudo de Wilson et al. (1993) descobriram que novos casos mastite subclínica e infecção crônica foram menores em vacas MAP-positivas e demonstrou que a taxa de infecção *Staphylococcus aureus* e *Serratia* spp. estava reduzido em vacas com paratuberculose. Embora a infecção mamária possa ocorrer por vários agentes infecciosos, a contribuição mútua de outras bactérias na ação do MAP sob a glândula mamária não é estabelecida.

Li et al., (2016), relataram que a presença de levedura morta e componentes de parede celular de levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, diminuíram a eficácia da ligação de MAP em células epiteliais mamárias de bovinos em estudo sob condições experimentais, sugerindo que esses componentes poderiam contribuir para a redução do risco de infecção por MAP na glândula mamária.

Embora um estudo experimental de Larsen e Miller (1978) e Schwarz, et al. (2018) tenham relatado que aparentemente MAP não causa inflamação da glândula mamária bovina, os achados de estudos subsequentes demonstraram a presença de MAP nas glândulas mamárias e no leite de animais sintomáticos ou assintomáticos (Streeter et al., 1995; Barrington et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a interação entre *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e as bactérias causadoras de mastite bovina, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) em condições experimentais.

3.2 Objetivos Específicos

(i) avaliar a capacidade da presença de MAP influenciar o processo de internalização de *S. aureus* ou *S. agalactiae*, em linhagens de células MAC-T, em relação a diferentes tempos de interação.

(ii) avaliar a viabilidade das células MAC-T durante os ensaios co-infectivos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre julho de 2017 a dezembro de 2018, nos Laboratórios de Doenças Bacterianas (LDBAC), Laboratório de Virologia Animal (LVA) e de Biologia Molecular (BIOMOL), localizados no Departamento de Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

4.1 Isolados bacterianos e cultura

Foram utilizados *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) cepa K-10 (isolado de bovino), isolado de *Staphylococcus aureus* (SA33) e de *Streptococcus agalactiae* (SA3930), ambos obtidos de leite bovino com mastite cedidos pela Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG).

4.1.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

MAP foi cultivado em caldo de Middlebrook (MB) 7H9 contendo 0,2% de glicerol, 10% de catalisador de dextrose de ácido oleico (OADC) e micobactina J (2 mg/L) (Allied Monitor, Inc. Fayette, MO), a 37 °C por aproximadamente seis semanas até atingir a densidade óptica $[OD_{600}] = 0.5$, equivalente a 10^6 UFC/mL, conforme padronizado por Schwarz, 2016. A pureza foi certificada por meio de cultivo microbiológico e ensaios moleculares (PCR - padrão do IS900).

4.1.2 *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*

Os isolados de *S. aureus* e *S. agalactiae* foram cultivados em ágar BHI durante 48 horas e uma colônia de cada isolado foi incubada durante 4 h a 37 °C em 5 mL de caldo BHI até atingir densidade óptica a $[OD_{600}] = 0.3$ equivalente a 10^7 UFC/mL, previamente padronizado. Resumidamente, os isolados foram cultivados em caldo BHI *overnight*, sendo 5 mL desta cultura transferidos no dia seguinte para 50 mL de caldo BHI estéril, sendo posteriormente incubados em estufa com agitação (rpm = 200), e aferido os valores de crescimento bacteriano entre 0,1 a 1,0.

Constatando o crescimento, procedeu-se o plaqueamento em ágar BHI em duplicata e repetidos por três vezes.

4.2 Células epiteliais da glândula mamária (MAC-T) e condições de cultura

As células MAC-T foram cultivadas em frascos de cultura celular T25 (TPP Techno Plastic, St. Louis, MO, EUA) a 37 ° C com 5% de CO₂, contendo Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) e 1% de penicilina / estreptomicina (100 µg/ml) até a confluência das células. Depois de visualizar a monocamada no microscópio de contraste de fase Nikon (Nippon Kogaku KK, Tóquio, Japão), as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7.2), ressuspensas em tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo o protocolo do LVA, e posteriormente utilizadas nos experimentos.

4.3 Ensaio de internalização bacteriana

O ensaio de internalização foi realizado seguindo o procedimento descrito anteriormente por Bouchard et al., 2013. As monocamadas confluentes de células MAC-T foram preparadas como descrito acima, lavadas duas vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente, ressuspensas com tripsina a 0,25% durante 5 minutos e coradas com 0,4% de azul de tripano (Invitrogen) para contagem de células viáveis em câmara de hemocítômetro. As células MAC-T foram distribuídas (3×10^5 células) em placas de poliestireno de 24 poços em meio de cultura celular (DMEM, FBS a 10%, sem antibióticos) e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 h. Uma seringa com agulha de calibre 21 foi utilizada para romper os grumos de MAP. Após 90-95% de confluência de monocamadas, as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente e desafiadas com MAP ($1,0 \times 10^6$ UFC) durante 2 h. Após esse período as células foram lavadas novamente por três vezes com PBS em temperatura ambiente e desafiadas com *S. aureus* e *S. agalactiae* ($1,0 \times 10^7$ UFC/mL) separadamente durante 10 min, 30 min e 120 min, seguindo um passo de incubação adicional de 2 h com DMEM suplementado com gentamicina (100 µg/mL). Este passo garantiu que qualquer

bactéria extracelular (aderida ou planctônica) não permanecesse viável devido à ação bactericida do antimicrobiano. Subsequentemente, os sobrenadantes de cultura foram descartados e as monocamadas foram lavadas quatro vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente e lisadas com 50 µL de tripsina 0,25% (p / v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e Triton X-100 a 0,1% (vol / vol) (Amersham, Arlington Heights, IL) em PBS (pH 7.2) durante 10 min. Os lisados foram submetidos a diluição seriada e plaqueados em ágar BHI, e as contagens bacterianas foram determinadas após incubação a 37°C durante 24h. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e repetidos três vezes.

4.4 PCR quantitativa em tempo real absoluta – qPCR

As amostras obtidas dos ensaios de invasão bacteriana foram primeiramente centrifugadas a 12.000 xg durante 5 min e lavadas duas vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente.

Para a extração de DNA, o kit DNeasy UltraClean Microbial Kit (50) – (QIAGEN) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante, com modificações. As quantificações das amostras de DNA foram realizadas em nanodrop.

As qPCRs foram realizadas através do kit “*bactotype* MAP PCR Kit (96) - (QIAGEN)”, seguindo as recomendações do fabricante, com intuito de confirmar a presença de MAP no interior das células MAC-T.

4.5 Viabilidade das células MAC-T

A viabilidade celular dos ensaios de internalização bacteriana, foi verificada por meio do teste de MTT (brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio). Células MAC-T foram cultivadas ($1,0 \times 10^5$ células) em três placas de poliestireno de 96 poços, separadamente nos tempos 10, 30 e 120 minutos. Cerca de 10 mL de MAP ($OD_{600} = 0.5$) foi transferido para tubo graduado tipo falcon e centrifugado por 5 minutos, a 4°C e 10.000 xg, descartando o sobrenadante e lavando duas vezes o sedimento com 10 mL de PBS (pH 7.2). Após lavagem, foi adicionado 10 mL de DMEM sem antibiótico e succionado com seringa acoplada de agulha para romper os grumos de MAP. Na sequência, foram inoculados 200 µL

MAP ($2,0 \times 10^5$ UFC) em meio DMEM sem antibiótico por 2 horas (1 mL de MAP = $1,0 \times 10^6$ UFC) nas placas de 96 poços contendo MAC-T. Após 2 horas de inoculação, as células foram lavadas com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente por 3 vezes, sendo adicionados 200 μ L ($1,0 \times 10^7$ UFC/mL) de *S. aureus* ou *S. agalactiae*, em meio DMEM sem antibiótico, sendo incubados por 10, 30 e 120 minutos. Nos poços para controle positivo foram adicionados 200 μ L de Triton X-100 a 0,1% (vol / vol). No controle negativo foram adicionados 200 μ L de DMEM sem antibiótico e também incubados por 10, 30 e 120 minutos. Após os tempos de incubação, os poços foram lavados com PBS em temperatura ambiente por 4 vezes. Em seguida foi adicionado o MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em PBS (pH 7.2) e aplicados 100 μ L em todos os poços, sendo incubados por 2 horas a 37 ° C em 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e, incubados por 20 min a 37 ° C em 5% de CO₂. A absorbância foi lida em espectrofotômetro leitor de placa a 550 nm

4.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-wilk. Os dados que tiveram distribuição normal foram apresentados como média e desvio padrão e comparados pelo teste ANOVA de uma via pelo teste de Tukey. Os dados não normais foram demonstrados como mediana e intervalo interquartilico e comparados pelo teste de Kruskal Wallis e pelo teste de Student Newman Keuls. Na comparação entre as variáveis MAC-T + agente e MAC-T + MAP + agente dentro dos tratamentos foi utilizado o teste T para amostras independentes e o teste de Mann Whitney. Esses dados foram analisados pelo programa SPSS 23 ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS

Para a realização dos ensaios de internalização bacteriana, foi realizada a padronização da curva de crescimento bacteriano, sendo definido tanto para *S. aureus* quanto para *S. agalactiae* (Tabela 1). A concentração das bactérias usadas foi $[OD_{600\text{ nm}}]= 0.3$ equivalente a $1,0 \times 10^7$ UFC/ml.

Tabela 1: Média dos valores da relação entre a densidade óptica (OD) e crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, isolados de mastite bovina.

OD _{600 nm}	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
	(UFC/mL)	
0,1	$4,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$
0,2	$8,9 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$
0,3	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
0,4	$1,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
0,5	$1,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
0,6	$1,7 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
0,7	$1,8 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
0,8	$2,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
0,9	$3,0 \times 10^7$	$5,8 \times 10^7$
1,0	$3,9 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$

No ensaio de internalização entre MAP e *S. aureus*, verificou-se diferença no tempo de 30 minutos, entre os tratamentos MAC + *S. aureus* e MAC-T + MAP + *S. aureus*, conforme demonstrado na tabela 2 (Figura 1). O tratamento MAC-T + *S. aureus*, demonstrou diferenças significativas entre os tempos 10 e 120 minutos ($p=0.001$), e entre os tempos 30 e 120 minutos ($p=0.048$). Já o tratamento MAC-T + MAP + *S. aureus*, demonstrou diferença entre os tempos 10 minutos e 30 minutos ($p=0.042$), e entre os tempos 10 e 120 minutos ($p<0.0001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), referentes aos ensaios de internalização bacteriana realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), e co-infectadas por *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina.

Tempos (minutos)	10	30	120
MAC-T + <i>S. aureus</i> (UFC/mL)	10 (30) ^b	6000 (9000) ^{*b}	180000 (89000) ^a
MAC-T + MAP + <i>S. aureus</i> (UFC/mL)	140 (265) ^d	20000 (10500) ^{*c}	79000 (175000) ^c

* diferença estatisticamente significativa da coluna 30 minutos entre os tratamentos ($p=0.001$); Letras minúsculas diferentes nas linhas: diferença estatisticamente significativa entre os momentos; Letras minúsculas iguais nas linhas: sem diferença estatisticamente significativa entre os momentos;

Quando a co-infecção foi realizada com *S. agalactiae*, os ensaios não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). O tratamento MAC-T + *S. agalactiae*, demonstrou diferenças significativas entre os tempos 10 e 120 minutos ($p<0.0001$), e entre os tempos 30 minutos e 120 minutos ($p=0.030$). Já o tratamento MAC-T + MAP + *S. agalactiae*, demonstrou diferença entre os tempos 10 e 120 minutos ($p<0.0001$), e entre os tempos 30 e 120 minutos ($p=0.029$) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), referentes aos ensaios de internalização bacteriana realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), e co-infectadas por *Streptococcus agalactiae* isolado de mastite bovina.

Tempos (minutos)	10	30	120
MAC-T + <i>S. agalactiae</i> (UFC/mL)	0 (0) ^b	20 (75) ^b	140 (68) ^a
MAC-T + MAP + <i>S. agalactiae</i> (UFC/mL)	0 (0) ^d	5 (15) ^d	170 (445) ^c

Letras minúsculas diferentes nas linhas: diferença estatisticamente significativa entre os momentos; Letras minúsculas iguais nas linhas: sem diferença estatisticamente significativa entre os momentos;

As amostras de DNA foram extraídas, quantificadas e armazenadas em ultra freezer a -80°C , para posterior realização dos ensaios de qPCR (Anexo I). Os ensaios de qPCR foram realizados para demonstrar a presença de MAP dentro das células MAC-T durante os ensaios de internalização bacteriana, com co-infecções por *S. aureus* ou *S. agalactiae*.

Os valores encontrados pela técnica de qPCR, foram expressos na forma de Ct, sendo convertidos para cópias genômicas de MAP, onde levou-se em consideração as informações fornecidas pelo Kit “bactotype MAP PCR Kit (24) - (QIAGEN), onde 8 µL do controle positivo, correspondem a 30 Ct, que corresponde a 200 cópias genômicas e a $8,73 \times 10^7$ UFC/mL. Durante os ensaios de qPCR foi evidenciado a presença de MAP em todos os tempos dos ensaios de internalização bacteriana (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios expressos em cópias genômicas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), obtidos por qPCR das amostras dos ensaios de internalização, previamente infectadas com MAP e co-infectadas separadamente por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Tempos (minutos)	10	30	120	Controle Positivo
Cópias genômicas (<i>S. aureus</i>)	152,92	165,06	162,26	202,13
Cópias genômicas (<i>S. agalactiae</i>)	148,99	165,90	164,43	198,46

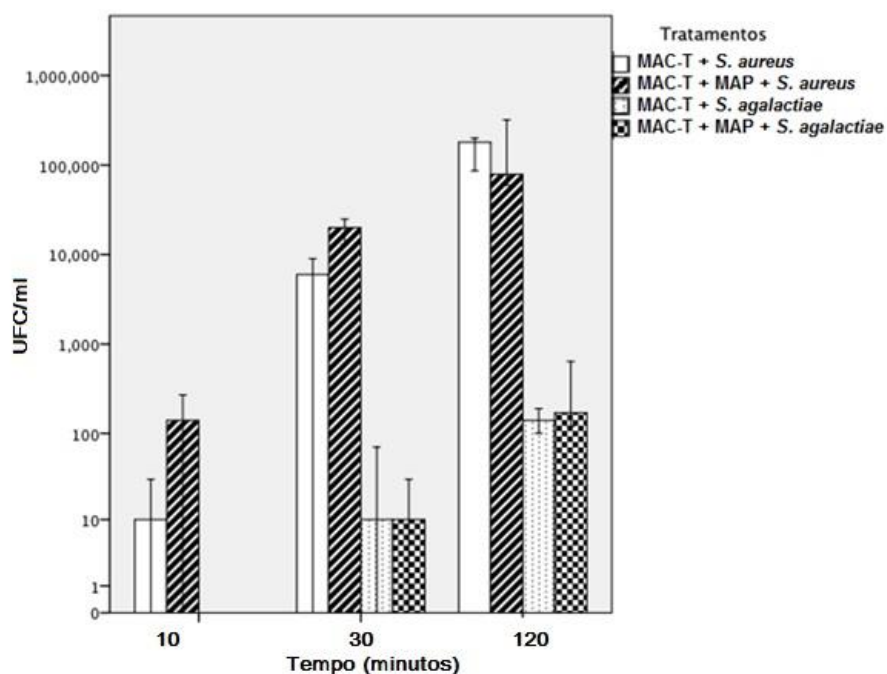


Figura 1. Comparação entre os tratamentos dos ensaios de internalização bacteriana em células MAC-T, previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e co-infectadas separadamente com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* realizados nos tempos 10, 30 e 120 minutos.

Os resultados obtidos pelos ensaios de MTT, com co-infecção de *S. aureus*, evidenciaram diferenças significativas no tempo 120 minutos (Figura 2), entre os tratamentos MAC-T + MAP + *S. aureus* e controle positivo ($p= 0.003$), e também entre os tratamentos MAC-T + MAP e controle positivo ($p<0.0001$), constatando a permanência da viabilidade celular de MAC-T durante todos os tempos dos ensaios de internalização bacteriana (Tabela 5).

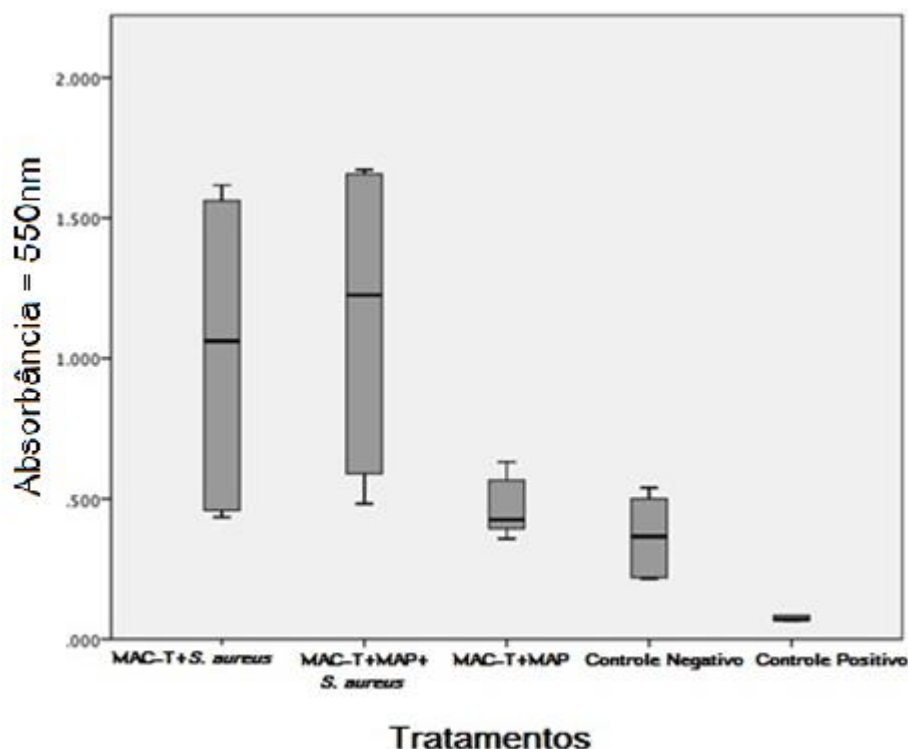


Figura 2. Comparação entre os tratamentos submetidos ao ensaio de MTT, após ensaio de internalização em células MAC-T previamente infectadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), sendo a co-infecção realizada por *Staphylococcus aureus*, no tempo 120 minutos.

Tabela 5. Valores médios de absorvância (550nm) dos ensaios de internalização realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), co-infectadas por *Staphylococcus aureus*, submetidas ao teste de MTT (brometo 3 - [4,5-dimetiltiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio).

Tempos (minutos)	10	30	120
MAC-T + <i>S. aureus</i>	0.370 (0.700)	0.659 (1.144)	1.062 (1.123)
MAC-T + MAP + <i>S. aureus</i>	0.481 (0.782)	0.711 (1.109)	1.225 (1.098) ^a
MAC-T + MAP	0.389 (0.615)	0.425 (0.534)	0.425 (0.197) ^a
Controle positivo (Triton 0,01%)	0.082 (0.033)	0.149 (0.174)	0.071 (0.019) ^b
Controle negativo (MAC-T)	0.315 (0.527)	0.265 (0.540)	0.366 (0.292)

Letras minúsculas na coluna 120 minutos diferentes: diferença significativa para *S. aureus*; Letras minúsculas na coluna 120 minutos iguais: sem diferença significativa para *S. aureus*;

No tempo 120 minutos (Figura 3), verificou-se diferença significativa entre os tratamentos MAC-T + *S. agalactiae* e o controle positivo ($p=0.044$), entre MAC-T + MAP + *S. agalactiae* e o controle positivo ($p= 0.027$) e entre MAC-T + MAP e o controle positivo ($p=0.015$), também constatando a permanência da viabilidade celular de MAC-T durante todos os tempos dos ensaios de internalização bacteriana (Tabela 6).

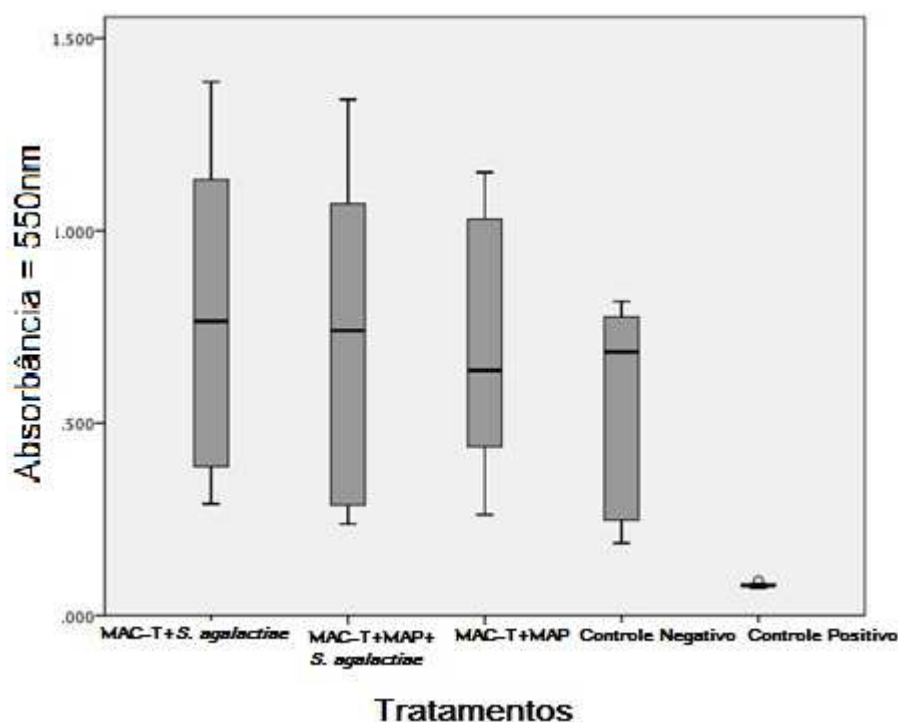


Figura 3. Comparação entre os tratamentos submetidos ao ensaio de MTT, após ensaio de internalização em células MAC-T previamente infectadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), sendo a co-infecção realizada por *Streptococcus agalactiae*, no tempo 120 minutos.

Tabela 6. Valores médios de absorbância (550nm) dos ensaios de internalização realizados em células epiteliais da glândula mamária (MAC-T), previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), co-infectadas por *Streptococcus agalactiae*, submetidas ao teste de MTT (brometo 3 - [4,5-dimetiltiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio).

Tempos (minutos)	10	30	120
MAC-T + <i>S. agalactiae</i>	0.338 (0.565)	0.422 (0.681)	0.764 (0.834) ^b
MAC-T + MAP + <i>S. agalactiae</i>	0.352 (0.527)	0.435 (0.584)	0.740 (0.863) ^b
MAC-T + MAP	0.338 (0.512)	0.384 (0.450)	0.637 (0.666) ^b
Controle positivo (Triton 0,01%)	0.081 (0.029)	0.145 (0.155)	0.078 (0.008) ^a
Controle negativo (MAC-T)	0.357 (0.592)	0.444 (0.670)	0,685 (0.553)

Letras minúsculas na coluna diferentes 120 minutos: diferença significativa para *S. agalactiae*; Letras minúsculas na coluna iguais 120 minutos: sem diferença significativa para *S. agalactiae*;

6. DISCUSSÃO

Hipotetizou-se neste trabalho que a infecção prévia por MAP facilita a interação com os agentes clássicos da mastite bovina, *S. aureus* ou *S. agalactiae*, podendo contribuir no agravamento da mastite e na permanência desses agentes no interior de células epiteliais mamárias. Na tentativa de constatar esta interação, foram realizados ensaios de internalização bacteriana em células MAC-T, previamente infectadas com MAP, e posteriormente co-infectadas por *S. aureus* ou *S. agalactiae*. Esta ideia é relevante, tendo em vista um estudo inédito realizado em nosso laboratório por Schwarz (2016), demonstrando a interação entre MAP e *E. coli*, onde a presença de *E. coli* poderia atrair MAP de regiões distantes como a lâmina própria ou os linfonodos supramamários, aumentando a liberação de MAP no alvéolo glandular. Este fato sugere uma possível interação entre MAP e bactérias isoladas de mastite bovina.

Os tempos utilizados nos ensaios de internalização bacteriana foram 10, 30 e 120 minutos, levando em consideração o processo de acidificação de fagossomos em macrófagos, que ocorre após 10 minutos de infecção por MAP, sendo completado por 120 minutos pós-infecção, conforme relatado por Kugadas et al. (2016).

Foi verificado neste trabalho que a infecção prévia de MAP em células MAC-T, favoreceu a rápida internalização de *S. aureus* no tempo 10 minutos, porém sendo significativa estatisticamente no tempo 30 minutos (Figura 1). Esses resultados corroboram com os estudos de co-infecção realizados em leveduras, por Li et al. (2016), onde foi observado que a presença dos componentes da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, interferiu na ligação de MAP com as células MAC-T e células epiteliais intestinais bovinas, reduzindo sua capacidade de adesão. Patel et al. (2006) descobriram que MAP apresentou maior capacidade de internalização em células MAC-T quando incubado previamente em leite cru a 37 ° C por 24 horas. Além disso, Lamont et al. (2012) relataram que as células do epitélio mamário formam junções justas de baixa resistência ou difusas que pode diminuir a resistência da transmembrana, facilitando a internalização. Fato semelhante poderia acontecer diante dos desafios realizados com *S. aureus*.

Embora saiba-se que MAP não causa inflamação da glândula mamária bovina (Larsen e Miller, 1978; Schwarz, et al., 2018), alguns estudos inferem a possibilidade

de que a glândula mamária seja um reservatório de MAP, contribuindo para o aumento da inflamação local do tecido ou a alteração da permeabilidade das células mamárias (Streeter et al., 1995; Barrington et al., 2003). No presente estudo, a internalização de *S. aureus* foi favorecida pela presença de MAP. Assim sugere-se que MAP possa estar contribuindo para persistência dos casos de mastite bovina por *S. aureus*.

A capacidade de *S. aureus* de invadir e sobreviver dentro das células epiteliais mamárias, conferindo proteção contra o sistema imune do hospedeiro e o tratamento com antibióticos, está entre os fatores que contribuem para a persistência desse patógeno, levando a uma infecção intramamária crônica (Almeida et al., 2001; Dego et al., 2002; Oviedo-Boyso et al., 2008).

O favorecimento da internalização de *S. aureus* causada por MAP neste estudo confronta os resultados obtidos pelo estudo de Wilson et al. (1993), onde relataram baixa incidência de casos de mastite subclínica e crônica, causada por *S. aureus* e *Serratia* spp. em bovinos com paratuberculose.

S. aureus apresenta múltiplos fatores de virulência (Bardiau et al., 2014), onde a interação bacteriana com as células hospedeiras é o primeiro passo no estabelecimento da mastite, que uma vez aderidas, as bactérias podem produzir biofilme, que consiste em uma matriz polissacarídica que auxilia na aderência e colonização ao epitélio da glândula mamária, protegendo as bactérias do sistema imune do hospedeiro e a ação antimicrobiana (Pereira et al., 2009).

Os resultados não significativos em 120 minutos (Tabela 2) sugerem que entre 30 e 120 minutos após a infecção, MAP provavelmente foi re-internalizado, sendo o período de 10 a 30 minutos mais significativo para o processo de internalização, quando co-infectado por *S. aureus*. Nesse contexto, Lamont et al. (2012), relataram que a rápida internalização de MAP e acidificação de fagossomos nas células MAC-T ocorreram entre 10 e 30 minutos. Patel et al. (2006) relataram que a passagem prévia de MAP através de células epiteliais mamárias aumentou após a invasão em células epiteliais intestinais. Ainda Schwarz, et al. (2018) relataram que a reinvasão da MAP pode ocorrer devido à passagem prévia da MAP pelas células MAC-T, e detectaram a diminuição de MAP em 120 minutos, nos ensaios realizados em células MAC-T, previamente infectados com *E. coli*.

O padrão ouro para detecção de MAP é o cultivo em meio sólido, como o meio Middlebrook (MB) (Collins et al., 1993). Porém, neste trabalho optou-se pela

detecção de MAP através de qPCR, tendo em vista as dificuldades diante do cultivo deste agente e pelo longo período para o desenvolvimento das primeiras colônias (12-16 semanas). Foram utilizados kits específicos para detecção de MAP, que proporcionaram mensurações de cópias genômicas de MAP dentro das células MAC-T durante os ensaios de internalização bacteriana, tanto com co-infecção por *S. aureus* quanto por *S. agalactiae* (Tabela 4), garantindo a presença de MAP durante todos os tempos de co-infecção.

Foi demonstrado pelo teste de MTT, que a baixa multiplicação de MAP durante os ensaios reflete sua lenta atividade mitocondrial é lenta, e que a evidente multiplicação de *S. aureus* uma atividade mitocondrial acelerada (Figura 2). Os resultados do teste de MTT para os ensaios de co-infecção por *S. agalactiae*, demonstraram que *S. agalactiae* se comportou em estado de não proliferação, havendo internalização, mas ausência de multiplicação celular significativa (Figura 3). Neste ensaio de MTT também constatou-se a permanência da viabilidade celular de MAC-T durante todos os tempos dos ensaios de internalização, concluindo que o processo de internalização não foi influenciado pela morte das células MAC-T e sim pela presença de MAP, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Esses resultados corroboram com os resultados relatados por Schwarz, (2016) onde o ensaio de MTT revelou que tanto MAP quanto para *E. coli*, não diminuíram a viabilidade de células MAC-T por 120 minutos, também avaliada nos tempos 10 e 30 minutos pós-infecção em diferentes tratamentos.

A co-infecção por *S. agalactiae* durante os ensaios de internalização não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3), evidenciando que a presença de MAP não favoreceu a internalização de *S. agalactiae* nas células MAC-T (Figura 1). Esses resultados sugerem que MAP e *S. agalactiae*, podem apresentar mecanismos semelhantes de internalização, talvez competindo pelos mesmos receptores.

No intestino, ao se internalizar, MAP realiza uma rápida supressão das vias de comunicação celular formando um complexo de junção intercelular capaz de estabelecer maior resistência à infecção, mas quando há uma diminuição na expressão de genes relacionados a esta via, este agente reduz a eficácia da barreira imune local (Khare et al., 2012). Mecanismos semelhantes aos descritos acima também podem estar ocorrendo na glândula mamária, e também a formação de

biofilme por MAP (Aboagye E Rowe, 2018), justificando a dificuldade da internalização de *S. agalactiae*.

7. CONCLUSÕES

Esses resultados confirmam a existência da interação entre MAP e os agentes clássicos da mastite bovina, *S. aureus* e *S. agalactiae*, favorecendo a internalização de *S. aureus* e não influenciando a invasão de *S. agalactiae* durante os ensaios de internalização bacteriana em células da glândula mamária bovina – MAC-T, realizados nos tempos 10, 30 e 120 minutos, podendo contribuir no agravamento da mastite e na permanência desses agentes no interior de células epiteliais mamárias.

Constatou-se a permanência da viabilidade celular de MAC-T durante todos os tempos dos ensaios de internalização, pelo teste de MTT, concluindo que o processo de internalização não foi influenciado pela morte das células MAC-T e sim pela presença de MAP, *S. aureus* e *S. agalactiae*.

8. PERSPECTIVAS

A continuação dos estudos, principalmente sobre os esclarecimentos dos reais comprometimentos inflamatórios da glândula mamária, se tornam fundamentais para compreender a patofisiologia de MAP, bem como das interações com os agentes clássicos da mastite bovina.

A realização de ensaios “*in vivo*” também é uma ferramenta importante para esta caracterização, tendo em vista que o comportamento e condições dos ensaios “*in vitro*” não são semelhantes, podendo apresentar resultados distintos.

O aprofundamento desses estudos proporcionará novas estratégias de controle destes patógenos em rebanhos de bovinos.

9. REFERÊNCIAS

ABOAGYE, G., ROWE, M. T.; Biofilm formation by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in aqueous extract of schmutzdecke for clarifying untreated water in water treatment operations; *bioRxiv*; 2018.

AIRES, T. A. C. P.; ***Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho.*** Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica De Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa; 2010.

ALVA-MURILLO, N.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 324-331.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDE, R. G.; ***Medicina Bovina. Doenças e Criação de Bovinos*** (2ª Ed., pp. 276-359) São Paulo, Editora Roca, 2008.

ARSENAULT, R. J., MAATTANEN, P., DAIGLE, J., POTTER, A., GRIEBEL, P., NAPPER, S.; From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 45, 54. 2014.

BANNANTINE, J. P., BERMUDEZ, L. E. No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* 81:3960–3965, 2013.

BANNANTINE, J. P., STABEL, J. R., LAWS, E., CARDIERI, M. C. D., SOUZA, C. D.; *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recombinant proteins modulate antimycobacterial functions of bovine macrophages. *PLoS One* 10:e0128966; 2015.

BARDIAU, M., DETILLEUX, J., FARNIR, F., MAINIL, J. G., OTE, I.; Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary microbiology*, 169(1-2), 74-79, 2014.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; ERIKS, I. S.; DAVIS, W. C.; EVERMANN, J. F.; EMERSON, C.; O'ROURKE, J. L.; HAMILTON, M. J.; BRADWAY, D. S. Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced paratuberculosis infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.15, p. 195–200, 2003.

BARROS, M. De; ***Atividade de 7-epiclusianona e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre sobre Streptococcus spp. isoladas de mastite bovina;*** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae; Viçosa – MG, 2016.

BECCARIA, C., SILVESTRINI, P., RENNA, M. S., ORTEGA, H. H., CALVINHO, L. F., DALLARD, B. E., & BARAVALLE, C.; *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. ***Microbial pathogenesis***; 2018.

BERMUDEZ, L.E.; PETROFSKY, M.; SOMMER, S.; BARLETTA, R.G. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M Cells 55 and enterocytes but has inefficient dissemination. ***Infection and immunity***, v.78, n.8, p.3570-3577, 2010.

BOUCHARD, D. S.; RAULT, L.; BERKOVA, N.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. ***Applied and Environmental Microbiology***. v.79(3), p.877-85, 2013.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T., VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. ***Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.***, 51 (2):129-135, 1999.

BYRD, S.R.; GELBER, R.; BERMUDEZ, L.E. Roles of soluble fibronectin and beta 1 integrin receptors in the binding of *Mycobacterium leprae* to nasal epithelial cells. ***Clinical Immunology and Immunopathology***, v.69, p.266-271, 1993.

CARVALHO, I.A.; SILVA JR, A.; CAMPOS, V.E.B.; MOREIRA, M.A.S. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. ***Journal of Dairy Science***, v.92, p. 5408-5410, 2009.

CARVALHO, I.A.; PIETRALONGA, P.A.; SCHWARZ, D.G.; FARIA, A.C.; MOREIRA, M.A. Short communication: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from retail pasteurized whole milk in Brazil. ***Journal of Dairy Science***. v. 95, n. 12, p.6946-6948, 2012.

CLARKE, C. J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. ***Journal of Comparative Pathology***, v.116. p. 217-261, 1997.

CLARK JR D.L., KOZICZKOWSKI J.J., RADCLIFF R.P., CARLSON R.A. & ELLINGSON J.L.E.; Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. ***J. Dairy Sci.*** 91:2620-2627, 2008.

COCITO, C., GILOT, P., COENE, M., DE KESEL, M., POUPART, P., VANNUFFEL, P.; Paratuberculosis. ***Clin. Microbiol. Rev.***, 7: 328-345, 1994.

CÔTÉ-GRAVEL, Julie; MALOUIN, François. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. ***Journal of dairy science***, 2018.

DEGO, O. K.; DIJK, J. V.; Nederbragt factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion, ***Vet. Q. H.*** 24, 181–198, 2002.

DORÉ, E.; PARÉ, J.; CÔTÉ, G.; BUCZINSKI, S.; LABRECQUE, O.; ROY, J. P.; FECTEAU, G. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p.32–45, 2012.

EMANEINI, M., JABALAMELI, F., ABANI, S., DABIRI, H., & BEIGVERDI, R.; Comparison of virulence factors and capsular types of *Streptococcus agalactiae* isolated from human and bovine infections. **Microbial pathogenesis**, 91, 1-4, 2016.

GUIRADO E, SCHLESINGER LS, KAPLAN G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. **Semin Immunopathol**, 35:563–583. 2013.

HENSEN, S. M.; PAVICIC, M. J. A. M. P.; LOHUIS, J. A. C. M.; POUTREL, B.; Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *Dairy Sci.* 83, 418-429, 2000.

JENSEN, K., GÜNTHER, J., TALBOT, R., PETZL, W., ZERBE, H., SCHUBERTH, H., SEYFERT, H., GLASS, E. J.; *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. **BMC Genomics** 14:36, 2013.

JIANG, L., SØRENSEN, P., RØNTVED, C., VELS, L., INGVARTSEN, K. L.; Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intramammary with lipopolysaccharide. **BMC Genomics** 9:443, 2008.

KHARE, S., LAWHON, S. D., DRAKE, K. L., NUNES, J. E., FIGUEIREDO, J. F., ROSSETTI, C. A., GULL, T., EVERTS, R. E., LEWIN, H. A., GALINDO, C. L., GARNER, H. R., ADAMS, L. G. Systems biology analysis of gene expression during in vivo *Mycobacterium avium paratuberculosis* enteric colonization reveals role for immune tolerance. **PLoS One**. v.7(8), p.4212; 2012.

KUDAHL, A. B.; NIELSEN, S. S. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, p.4340–4346, 2009.

KUMAR, S., KUMAR, S., SINGH, R. V., CHAUHAN, A., KUMAR, A., BHARATI, J., & SINGH, S. V.; Association of Bovine CLEC7A gene polymorphism with host susceptibility to paratuberculosis disease in Indian cattle. **Research in veterinary science**, 2019.

LAMONT, E. A.; O'GRADY, S. M.; DAVIS, W. C.; ECKSTEIN, T.; S. SREEVATSAN. Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* results in rapid interleukin-1 release and macrophage transepithelial migration. **Infection and Immunity**, v.80, p. 3225–3235, 2010.

LAMONT, E. A., O'GRADY, S. M., DAVIS, W. C., ECKSTEIN, T., SREEVATSAN, S.; Infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* results in rapid interleukin-1beta release and macrophage transepithelial migration. **Infect. Immun.** 80:3225–3235, 2012

LARSEN, A.B.; MILLER, J.M. Mammary gland exposure of cows to *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 1972-1974, 1978.

LI, Z., YOU, Q., OSSA, F., MEAD, P., QUINTON, M., KARROW, N. A. Assessment of yeast *Saccharomyces cerevisiae* component binding to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using bovine epithelial cells. **BMC Vet. Res.** v. 12 (42), p.3-10; 2016.

LOMBARD, J. E.; GARRY, F. B.; MCCLUSKEY, B. J.; WAGNER, B. A. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p.1975–1981, 2005.

LOMBARD, J. E. Epidemiology and economics of paratuberculosis. **Vet Clin Food Anim.** v.27, p. 525-535. 2011.

MARINO, R., CAPOFERRI, R., PANELLI, S., MINOZZI, G., STROZZI, F., TREVISI, E., WILLIAMS, J. L.; Johne's disease in cattle: an in vitro model to study early response to infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using RNA-seq. **Molecular immunology**, 91, 259-271, 2017.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-sisa/Listadoencasanimaisdenotificaoobrigatoria.pdf/view>> acesso em 04/02/19.

MCKENNA, S. L.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J.; BARKEMA, H. W. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, p.1089–1099, 2006.

MENDOZA, J.L., LANA, R., Z-RUBIO, M.D.; *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* AND ITS RELATIONSHIP WITH CROHN'S disease. **World J. Gastroenterol.** 15 (4), 417–422, 2009.

NIELSEN, S. S. **Paratuberculosis in dairy cattle—epidemiological studies used for design of a control program me in Denmark**. University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark, Thesis, 2009.

OIE 2019; World Organisation for Animal Health; 2019. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Paratuberculosis/>> acesso em: 04/02/2019.

OVIEDO-BOYSO, J.; et al., Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-kappa B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 beta, **Scand. J. Immunol.** 67, 169–176, 2008.

PATEL D.; DANELISHVILI, L.; YAMAZAKI, Y.; ALONSO, M.; PAUSTIAN, M. L.; BANNANTINE, J. P.; MEUNIER-GODDIK, L.; BERMUDEZ, L. E.. The ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. ***Infection and Immunity***, v. 74. p. 2849 –2855, 2006.

PATEL, A.; SHAH, N. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. ***Journal of Microbiology, Immunology and Infection***, v. 44, p. 473-479, 2011.

PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A., SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P.; Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. ***Food Microbiol.*** 26:278–282, 2009.

PIERCE, E.S.; Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? ***PLoS Pathog.*** 5 (3), e1000234; 2009.

QUINN, P. J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., FITZPATRICK, E. S., FANNIG, S.; HARTIGAN, P. J.; ***Veterinary Microbiology and Microbial Disease*** (2nd Ed., pp. 469-2250) Oxford, Wiley-Blackwell, 2011.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W.; Clínica Veterinária. ***Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*** (9ª Ed., pp. 541-629) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

SALLAM, A. M.; ZARE, Y.; SHOOK, G.; COLLINS, M.; KIRKPATRICK, B. W.; A positional candidate gene association analysis of susceptibility to paratuberculosis on bovine chromosome 7. ***Infection, Genetics and Evolution***, 65, 163-169, 2018.

SCHWALM, A. K., OBIEGALA, A., PFEFFER, M., & STING, R.; Enhanced sensitivity and fast turnaround time in laboratory diagnosis for bovine paratuberculosis in faecal samples. ***Journal of microbiological methods***, 152, 39-47, 2018.

SCHWARZ, D. G. G. CARVALHO, I. A., PIETRALONGA, P. A. G., FARIA, A. C., MOREIRA, M. A. S. Paratuberculose em pequenos ruminantes domésticos. ***Arq. Inst. Biol.***, v. 79, p. 443-452, 2012.

SCHWARZ, D. G. G., et al., Expressão gênica de citocinas e detecção molecular de órgãos da paratuberculose da subespécie *Mycobacterium avium* de camundongos experimentalmente infectados. ***Pesq. Veterinário***. Bras. Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 396-402, 2015.

SCHWARZ, D. G. G.; ***Studies on the interaction between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and bovine mastitis associated Escherichia coli in a mammary epithelial cell model and identification of passive shedding in small ruminants***; Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das

exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Doctor Scientiae, Viçosa – MG, 2016.

SCHWARZ, D. G. G.; SHOYAMA, F. M.; OLIVEIRA, L. L.; SREEVATSAN, S.; MOREIRA, M. A. S.; Rapid baso-apical translocation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in mammary epithelial cells in the presence of *Escherichia coli*; **Journal of Dairy Science**; v. 101, p. 6287-6295; 2018.

SECOTT, T.E.; LIN, T.L.; WU, C.C. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-Cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. **Infection and immunity**, v.72, n.72, p.3724-3732, 2004.

SMITH, B. P.; **Large Animal Internal Medicine** (4th Ed., pp. 1112-1138) St. Louis, MO, Mosby Elsevier, 2009.

SMITH, R. L.; GROHN, Y. T.; PRADHAN, A. K.; WHITLOCK, R. H.; VAN KESSEL, J. S.; SMITH, J. M.; WOLFGANG, D. R.; SCHUKKEN, Y. H. A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 2653–2661, 2009.

SORDILLO L. M., STREICHER K. L.; Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**;7: 135e46, 2002.

SOUZA, M. C. C., LIMA, M. C., BRAGA, I. F. E., SCHWARZ, D. G. G., RODRIGUES, A. N. S., SALES, E. B., JUNIOR, A. N. F., MOREIRA, M. A. S. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. **Small Rum. Res.** v.140, p.18–21. 2016.

STREETER, R. N.; HOFFSIS, G. F.; BECH-NIELSEN, S.; SHULAW, W. P.; RINGS, D. M. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1322–1324, 1995.

SVENNESEN, L., MAHMMOD, Y. S., SKJØLSTRUP, N. K., MATHIASSEN, L. R., KATHOLM, J., PEDERSEN, K., NIELSEN, S. S.; Accuracy of qPCR and bacterial culture for the diagnosis of bovine intramammary infections and teat skin colonisation with *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* using Bayesian analysis. **Preventive veterinary medicine**, 161, 69-74, 2018.

SWEENEY, R. W. Transmission of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 12, p. 305–312, 1997.

SWEENEY, R. W. Pathogenesis of paratuberculosis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract** 27:537–546, 2011.

TIMMS, V. J.; GEHRINGER, M. M.; MITCHELL, H. M.; DASKALOPOULOS, G.; NEILAN, B.A. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? **Journal of Microbiological Methods**, v.85, p.1-8, 2011.

TIMMS, V. J.; DASKALOPOULOS, G.; MITCHELL, H. M.; NEILAN, B. A. The Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Inflammatory Bowel Disease. ***Plos One***, 2016.

VERGNE I, CHUA J, LEE HH, LUCAS M, BELISLE J, DERETIC V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. ***Proc Natl Acad Sci***, 102:4033–4038, 2005.

WILSON, D. J., ROSSITER, C., HAN, H. R., SEARS, P. M.; Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate clinically normal dairy cows. ***Am. J. Vet. Res.*** 54:1851–1857, 1993.

WINDSOR, P. A.; WHITTINGTON, R. J. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. ***Veterinary Journal***, v.184, p. 37–44, 2010.