

PRICILA APARECIDA GRASSE PIETRALONGA

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS PADRÃO Th1 e Th2 EM CAMUNDONGOS
C57BL/6 DURANTE INFECÇÃO DE *Mycobacterium avium* subsp.
*paratuberculosis***

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
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P625e
2012

Pietralonga, Pricila Aparecida Grasse, 1983-
Expressão de citocinas padrão Th1 e Th2 em camundongos
C57BL/6 durante infecção de *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis*. / Pricila Aparecida Grasse Pietralonga.
– Viçosa, MG, 2012.
xiv, 44f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 33-44.

1. Ruminante - Doenças. 2. Citocinas. 3. Paratuberculose.
4. *Mycobacterium avium paratuberculosis*. 5. Camundongo.
6. Biologia molecular. 7. Bactérias patogênicas. 8. Bactérias
gram-positivas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.


CDD 22. ed. 636.208969294

PRICILA APARECIDA GRASSE PIETRALONGA

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS PADRÃO Th1 E Th2 EM CAMUNDONGOS
C57BL/6 DURANTE INFECÇÃO DE *Mycobacterium avium* subsp.
*paratuberculosis***

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: 04 de setembro de 2012.


Abelardo Silva Júnior


Sérgio Oliveira de Paula


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

**A Deus
A minha família.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e iluminar os meus caminhos.

Aos meus amados pais, Tadeo Pietralonga e Maria Luiza Grasse Pietralonga pela enorme compreensão e por nunca medirem esforços em apoiar as minhas escolhas, muitas vezes mesmo sem compreendê-las.

Aos meus irmãos, Cleber e Thaiana, pela eterna compreensão e apoio. A minha cunhada Raniani por me receber sempre com alegria e ao meu amado afilhado e sobrinho Arthur pelos momentos de alegria proporcionados pela sua vivacidade e inocência.

A minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, pelo exemplo de competência e profissionalismo. Muito obrigada pela oportunidade, confiança, amizade, disponibilidade em partilhar seus conhecimentos, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos professores Abelardo e Laércio pela co-orientação, pelo apoio, conhecimentos transmitidos e tempo dispensado à realização desta dissertação. Ao Professor Yung-Fu Chang, da “College of Veterinary Medicine - Cornell University” por ceder a cepa MAP66115-98.

Ao David, pelo companherismo, incentivo, pelo seu exemplo de vida e superação e pela sua amizade e momentos de alegria.

À Isabel, pelos conselhos, paciência em ensinar, pela sua alegria contagiante e amizade.

À Maria Alejandra e Juliana pelos momentos de descontração, trabalho e amizade.

Aos companheiros de laboratório Fábio, Vitor, Cristian, Carol, Marina, Bernardo, Pedro e Isis, pelo trabalho em equipe e pela sincera amizade.

REUNI-CAPES pela bolsa.

A Rose e Bety, secretárias da Coordenação de Pós-graduação, pela ajuda prestada. Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV, em especial ao Luiz Carlos, sempre disposto a contribuir da melhor forma para o andamento dos experimentos.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta etapa.

BIOGRAFIA

Pricila Aparecida Grasse Pietralonga, filha de Tadeo Pietralonga e Maria Luiza Grasse Pietralonga nasceu em 28 de maio de 1983, na cidade de Alfredo Chaves- ES.

Em outubro de 2004, iniciou seus estudos acadêmicos na Universidade Federal do Espírito Santo, no curso de Medicina Veterinária. Em agosto de 2009, pela mesma instituição, graduou-se Médico Veterinário.

Em agosto de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, sob orientação da professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. De agosto a dezembro de 2011, foi monitora nível II nas disciplinas de Microbiologia Veterinária, Doenças Bacterianas, Doenças Virais e Higiene Veterinária, de março a julho de 2012, bolsista Reuni nas disciplinas de Epidemiologia Veterinária, Epidemiologia Aplicada ao Saneamento Ambiental e Saneamento e em setembro de 2012 submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. OBJETIVO	11
3.1. Objetivos específicos	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 – Animais	12
4.2 – <i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i> - cepa MAP66115-98	12
4.3 – Obtenção do inóculo	13
4.4 – Bioensaio	13
4.5 – Reação em Cadeia de Polimerase – PCR quantitativo	13
4.5.1– Extração de RNA	14
4.5.2 – Síntese de cDNA	14
4.5.3 – Reações de PCR quantitativo	15
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
8. CONCLUSÃO	32
9. REFERÊNCIAS.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferença estatística significativa apresentada pela expressão relativa dos transcritos de RNA das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α	20
Figura 2 - Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na quarta semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98.....	21
Figura 3 - Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na oitava semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98.....	23
Figura 4 - Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na décima segunda semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98.	25
Figura 5 - Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na décima sexta semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfis de expressões das citocinas pró e anti-inflamatórias nos órgãos analisados nos quatro períodos do experimento.....	19
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR Tempo Real Quantitativa para os genes que codificam as citocinas estudadas.....	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR – bacilos álcool ácido resistente
 β – beta
°C – graus Celsius
cDNA – ácido desorribonucleico complementar
Ct – ciclo *threshold*
DC – doença de Chron
DNA – ácido desorribonucleico
DEPC – dietilpirocarbonato
DO – densidade óptica
ELISA – ensaio imunoenzimático
FAP – fibronectina
Foxp3 – *forkhead box P3*
g – grama
g – aceleração da gravidade
HE – hematoxilina e eosina
IFN- γ – interferon gama
IL– interleucina/ citocinas
IP – intraperitoneal
IS – sequência de inserção
MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
 μ l – microlitro
nM – nanomolar
pb – pares de base
PBS – tampão fosfato salina
PCR – reação em cadeia da polimerase
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
q-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA – ácido ribonucleico

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

subsp. – subespécies

TBE – tris borato EDTA

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

Th – linfócitos auxiliares

UFC – unidade formadora de colônia

UFV – Universidade Federal de Viçosa

UV – ultravioleta

$\gamma\delta$ – gama delta

ZN – *Ziehl-Neelsen*

RESUMO

PIETRALONGA, Pricila Aparecida Grasse, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2012. **Expressão de citocinas padrão Th1 e Th2 em camundongos C57BL/6 durante infecção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior e Laércio dos Anjos Benjamin.

Mycobacterium avium subespécie *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da paratuberculose, uma enfermidade que causa enterite granulomatosa crônica preferencialmente em ruminantes domésticos e silvestres. É considerada uma doença de impacto econômico e social, devido às perdas no rebanho e na saúde humana, uma vez que se têm indícios da possível relação de MAP com a doença de Crohn. Contudo, muito ainda se desconhece sobre o desenvolvimento da patofisiologia e imunopatogênese desta doença, nos locais da infecção. Desse modo, este estudo propôs verificar a resposta de citocinas pró e anti-inflamatórias por meio da técnica de PCR quantitativo e associar a expressão destas citocinas com as lesões e a presença do agente em órgãos de camundongos C57BL/6 infectados por via intraperitoneal com a cepa MAP66115-98. Em 20 camundongos foram aplicados 250µl de inóculo a 3×10^8 UFC/ml e, em oito controles foram aplicados PBS. Os animais foram sacrificados aos 30, 60, 90 e 120 dias pós-inoculação. Em cada período, foram coletado baço, fígado, intestino (cólon e íleo) e placas de Peyer de cinco camundongos desafiados e de dois controles. Verificou-se na maioria, uma regulação positiva nos perfis de expressões das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e TNF- α , e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 nos órgãos analisados em relação aos controles durante o período do experimento. Observaram-se também regulações negativas na quarta semana no baço e colón, na décima segunda no baço, íleo e placa de Peyer e na décima sexta semana no fígado, colón e íleo. Diferenças estatísticas foram observadas somente na oitava semana após o desafio no fígado para IFN- γ , no baço para expressão da IL-2 e IFN- γ e no íleo para IL-4 e TNF- α . Na quarta semana, foi possível identificar aumento dos níveis de transcritos de RNAm das citocinas estudadas. No fígado, íleo e colón o IFN- γ apresentou maior nível de transcritos de RNAm em relação ao controle negativo, no entanto no baço os maiores níveis foram observados para a IL-10. Somente na oitava

semana foi possível observar diferença estatística significativa para a citocina IFN- γ , em amostras do fígado e baço, para o TNF- α e IL-4 no íleo e para a IL-2 no baço. Os maiores níveis de transcrito de RNAm foram observados no fígado, para o IFN- γ , no baço para a IL-2, no íleo e placa de Peyer para a IL-4 e no colón para a IL-10. Na décima segunda semana, os maiores níveis de transcrito de RNAm foram observados no fígado para a IL-10, no baço e íleo para a IL-2, no colón para o TNF- α e na placa de Peyer para a IL-4. Na décima sexta semana, os maiores níveis de transcrito de RNAm foram observados no fígado e colón para a IL-10, no baço e íleo para o IFN- γ e na placa de Peyer para o TNF- α . Os animais apresentaram uma maior expressão dos transcritos de RNAm das citocinas estudadas nos órgãos após o desafio com MAP, embora não tenham sido verificadas alterações macro e microscópica (coloração de Hematoxilina e Eosina). No entanto foi possível observar presença de bastonetes álcool ácido resistentes em duas amostras de placas de Peyer, (coloração de *Ziehl-Neelsen*) e pela técnica de *nested*-PCR foi possível observar a presença de MAP em todos os órgão analisados. Assim, estes resultados contribuem para a melhor compreensão da expressão de citocinas pró e anti-inflamatória nos locais da infecção em diferentes tempos pós-inoculação tanto em órgãos tidos como sitio específicos de MAP como intestino (colón e íleo) e placa de Peyer e órgãos extra-intestinais, e com isso buscar o melhor entendimento da imunopatogênese nos locais da infecção.

ABSTRACT

PIETRALONGA, Pricila Aparecida Grasse, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2012. **Expression of cytokines Th1 and Th2 cells in C57BL/6 mice during infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***. Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior and Laércio dos Anjos Benjamin.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent of paratuberculosis, a disease which causes chronic granulomatous enteritis preferably in domestic and wild ruminants. It is considered a disease of economic and social impact, because of losses in livestock and importance in human health, since there is evidence of possible correlation of MAP with Crohn's disease. However, much is still unknown about the developing the pathophysiology and immunopathogenesis this disease, in the sites of infection. Thus, this study has proposed verify the response of cytokines proinflammatory and anti-inflammatory by quantitative PCR and associate the expression of these cytokines with the lesions and the presence of the agent in organs of C57BL/6 mice infected intraperitoneal with strain MAP66115-98. It was applied 250µl of inoculum at 3×10^8 UFC/ml in 20 mice, and it was applied saline phosphate buffers (PBS) in eight control species. The animals were sacrificed at 30, 60, 90 and 120 days post-inoculation. In each period were collected spleen, liver, intestine (ileum and colon) and Peyer's patches of five challenged mice and two controls. It was found in the majority an upregulation in the expression profiles of proinflammatory cytokines IL-2, IFN-, and TNF- α γ , and anti-inflammatory IL-4 and IL-10 analyzed in the organs compared to controls during period of the experiment. It was observed also negative regulations in the fourth week in spleen and colon, twelfth in the spleen, ileum and Peyer's patch and the sixteenth week in the liver, colon and ileum. Statistical differences were only observed at the eighth week after the challenge for IFN- γ in liver, in spleen for expression of IL-2 and IFN- γ and in the ileum for IL-4 and TNF- α . In the fourth week, it was possible to identify increased levels of mRNA transcripts of the cytokines studied. In the liver, ileum and colon IFN- γ showed the highest level of mRNA transcripts compared to the negative control, however at higher levels spleen were observed for IL-10. Only eight weeks it was possible to observe a statistically significant difference for

the cytokine IFN- γ in the liver and spleen samples for TNF- α and IL-4 in the ileum and IL-2 in spleen. The highest levels of mRNA transcript were observed in the liver for IFN- γ , spleen for IL-2, and in the ileum Peyer's patch for IL-4 and colon for IL-10. In the twelfth week, the major mRNA transcript levels were observed in liver for IL-10 in spleen and ileum for IL-2 in colon for TNF- α and Peyer's patch for IL-4. In the sixteenth week, the major mRNA transcript levels were observed in liver and colon for IL-10 in spleen and ileum for IFN- γ and Peyer's patch for TNF- α . The animals showed increased expression of mRNA transcripts of cytokines studied organs after challenge with MAP, although not verified gross and microscopic changes (hematoxylin and eosin staining). However it was possible to observe the presence of alcohol-acid resistant rods in two samples of Peyer's patches (Ziehl-Neelsen) and nested-PCR technique was possible to observe the presence of MAP in every organ analyzed. Thus, these results contribute to a better understanding of the expression of proinflammatory and anti-inflammatory in local infection at different post-inoculation in both organs taken as site specific as MAP intestine (colon and ileum) and Peyer's patch and organs extraintestinal, and thus find a better understanding of the immunopathogenesis of infection in the local.

1. INTRODUÇÃO

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da paratuberculose, também conhecida como doença de Johne que é caracterizada por uma enterite granulomatosa crônica, incurável em ruminantes levando a diarreia, perda de peso e morte. Com distribuição mundial, provoca elevadas perdas econômicas na pecuária. Semelhanças clínicas e histológicas entre a paratuberculose e doença de Crohn tem sido observadas, no entanto, a implicação de MAP nesta enfermidade ainda não está totalmente esclarecida.

A principal rota de transmissão do agente é a oro-fecal através da ingestão de alimentos ou água contaminada por fezes de animais acometidos. A progressão da doença é classificada em três fases relacionada com a gravidade dos sinais clínicos e disseminação do agente, a fase silenciosa se inicia após a ingestão dos bacilos e que posteriormente sobrevivem à fagocitose pelos macrófagos, no fagossoma ocorre à replicação bacteriana, nesta etapa não há excreção de bactérias. A fase subclínica com baixa excreção fecal, os animais infectados eliminam o agente nas fezes, com isso contaminando o meio ambiente e disseminando o agente no rebanho, nesta fase a resposta imune é mediada por célula que confere importante imunidade protetora contra a infecção e produzem diferentes tipos de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e início da produção de anticorpos. Na fase clínica com alta excreção fecal que se caracteriza pelo início dos sinais clínicos com gradual perda de peso e diarreia intermitentes, com a progressão da doença ocorre à redução da produção de leite, edema difuso, anemia e infertilidade, podendo levar os animais a óbito, durante esta fase, ocorre o aumento das células Th2 e mudança na resposta imune de celular para humoral, com produção de citocinas anti-inflamatórias como, IL-4 e IL-10, com isso, estimulando a produção de anticorpos e a diminuição da resposta do IFN- γ .

Normalmente a definição da resposta imune durante a infecção por MAP é realizada através da análise de sangue periférico e com isso a resposta imune no local da infecção é pouco conhecida. Este estudo avaliou e quantificou a expressão de citocinas em órgãos como: intestino (íleo e colón) e placa de Peyer que são definidos

como sítios primários da infecção em animais naturalmente contaminados e em órgãos extra-intestinais como: fígado e baço, que possuem importância no desenvolvimento da doença sistêmica. Assim será possível definir a expressão de citocinas e associar com a presença de lesões e do agente nestes órgãos de camundongos C57BL/6 infectados experimentalmente com a cepa MAP66115-98, de forma a contribuir para o melhor entendimento da imunopatogênese nestes sítios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enterite granulomatosa crônica, que acomete principalmente os ruminantes e em menor intensidade outras espécies animais. É causada pela ingestão *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) um BAAR do gênero *Mycobacterium*. Após um longo período de latência, os animais iniciam a disseminação do agente nas fezes (COCITO et al., 1994; BENEDICTUS et al., 2008), e desta forma, contaminam o ambiente, o que é considerado a principal fonte de infecção para o rebanho (NIELSEN e TOFT, 2009).

Inicialmente descrita por Johne e Frothingam em 1895 em bovinos, na Alemanha, e atualmente apresentando distribuição mundial. No Brasil, o primeiro registro de paratuberculose em bovino foi feito por Dupont (1915), no Rio de Janeiro (SANTOS e SILVA, 1956; LILENBAUM et al., 2007). O agente tem sido identificado em amostras de leite, soro sanguíneo, fezes e tecidos de bovinos, caprinos e de ovinos em varias regiões do país (FONSECA et al., 2000; FERREIRA et al., 2001; GOMES et al., 2002; ACYPRESTE et al., 2005; MOTA et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; COSTA et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2010).

Na maioria das vezes os animais se contaminam nos primeiros seis meses de idade sendo estes mais suscetíveis que os adultos (WINDSOR e WHITTINGTON, 2010). A rota ora-fecal é a principal via de infecção frequentemente associado com o contato dos bezerros com úberes e tetos sujos com fezes contaminadas durante o aleitamento (SWEENEY, 1996; CLARKE, 1997; DORÉ et al., 2012). A via intrauterina e a transmissão por aerossóis podem ser definidas como fontes secundarias de contaminação (NIELSEN et al., 2008; EISENBERG et al., 2011; OKURA et al., 2012). A doença clínica se manifesta apenas na vida adulta, geralmente de dois a cinco anos após a infecção subclínica sendo caracterizada por diarreia intermitente, redução da produção de leite, desidratação e emagrecimento progressivo (DRIEMEIER et al., 1999; RADOSTITS et al., 2002). Não há tratamento adequado, devido ao alto custo por animal e desfechos clínicos (HARRIS e BARLETTA, 2001), o sacrifício é indicado.

As infecções por MAP são economicamente importantes por infligir perdas significativas na indústria de laticínios devido a diminuição na produção de leite

(LOMBARD et al., 2005, SMITH et al., 2009) aumento do descarte precoce , baixo valor de venda dos animais e infertilidade (MCKENNA et al., 2006; KUDAHL e NIELSEN, 2009). Nos Estados Unidos tem sido observado o aumento da prevalência no rebanho bovino e com isso elevadas perdas econômicas (OTT et al., 1999; USDA-APHIS, 2011). Na Austrália, em algumas regiões, 40% dos rebanhos de ovinos são infectados, e estão associados com taxas de mortalidade anual de 2-15%, (BUSH et al., 2006). Em países, tais como Estados Unidos, Austrália, Japão, Holanda e Dinamarca ao longo das últimas décadas programas foram implantados e reimplantados com a intenção de controlar e erradicar a paratuberculose (BENEDICTUS et al., 2000; NIELSEN, 2007; NIELSEN, 2009). No Brasil, no entanto, apesar da ocorrência da doença (RISTOW et al., 2007; MOTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010), ainda não há dados oficiais quantificando perdas produtivas nos rebanhos e nenhum programa governamental de controle implantado. YAMASAKI et al., (2010), consideram que devido à lenta disseminação e ao caráter crônico, os prejuízos econômicos são disfarçados pelas alterações secundárias à infecção por MAP.

O potencial zoonótico de MAP ainda não está completamente estabelecido, mas tem sido associado com a etiologia da doença de Chron uma enterite granulomatosa crônica, de etiologia não totalmente desconhecida (COUSSENS, 2004; ORMAECHEA et al., 2009). Estudos revelam que foi identificado a presença de MAP em amostra de tecido intestinal em uma alta porcentagem de pacientes com DC (GREENSTEIN, 2003; GRANT, 2005; FELLER et al, 2007). Sabendo que os animais eliminam o bacilo também no leite em determinadas fases da doença e ainda que o micro-organismo pode resistir à pasteurização, este por sua vez pode ser uma fonte potencial de contaminação humana (GRANT et al., 1996; GRANT et al., 2002; LILENBAUM et al., 2007).

A progressão da paratuberculose é classificada em três fases relacionadas com a gravidade dos sinais clínicos e com a disseminação do agente: a fase silenciosa (fase I) se inicia após a ingestão dos bacilos que resistiram à defesa inata do hospedeiro e no intestino atravessaram a mucosa por endocitose principalmente pelas células M das placas de Peyer no íleo (ALONSO-HEARN et al., 2008) e provavelmente usam a fibronectina (FAP), uma proteína presente na parede celular de MAP para se ligar em

receptores de integrina presentes na membrana das células M (SECOTT et al., 2004). A preferência de MAP, pelas células M pode estar relacionada à abundância de integrina na superfície celular, no entanto, MAP ainda pode se ligar a outras células por mecanismos independentes (SIGURDARDOTTIR et al., 2004). Posteriormente, ao sobreviver à fagocitose, ocorre a replicação no fagossoma e não há excreção de bactérias para o meio externo. Semanas após, ocorre à disseminação do bacilo para outros macrófagos, nesta etapa pode ocorrer à recuperação espontânea do animal ou a progressão da doença. No caso de progressão, os organismos são encontrados principalmente no trato gastrointestinal como na lâmina própria do intestino, mucosa do jejunos e íleo e linfonodos regionais (CLARKE, 1997; WHITTINGTON e SERGEANT, 2001). A disseminação de MAP para tecidos extra-intestinais tem sido demonstrada em infecções disseminadas em bovinos e ovinos naturalmente infectados, por cultura e ou detecção de DNA de MAP a partir de amostras de tecidos em estádios subclínicos e clínicos, incluindo os gânglios linfáticos diversos, fígado, rim, pulmão, coração, músculo esquelético e tecidos reprodutivos (GWOZDZ et al., 1997, 2000; EPPLESTON e WHITTINGTON, 2001; LAMBETH et al., 2004; ANTOGNOLI et al., 2008; ALONSO-HEARN et al., 2009; REDDAKLIFF et al., 2010). Esta distribuição indica que a difusão microbiana através da via hematogena pode ocorrer durante a infecção.

Na fase subclínica (fase II) com baixa excreção fecal, ocorre aumento progressivo do IFN- γ e o início da produção de anticorpos (BASSEY e COLLINS, 1997), os bacilos eliminados nas fezes, podem ser isolados através da coprocultura, teste padrão-ouro para o diagnóstico. Uma característica interessante de MAP é que, apesar do seu crescimento *in vivo* ser relativamente rápido, *in vitro* o surgimento das colônias é fastidioso, necessitando aproximadamente 8 a 16 semanas de incubação à 37⁰C e adição de micobactina *J* ao meio de cultura (COUSSENS, 2004). Anos após a infecção se instalar, a fase clínica (fase III) com alta excreção fecal se caracteriza pelo início dos sinais clínicos, como gradual perda de peso e diarreia intermitentes, ocorrendo o desenvolvimento de imunidade humoral. Com a progressão da doença ocorre à redução da produção de leite, edema difuso, anemia e infertilidade, podendo levar os animais a óbito (COCITO et al., 1994; WHITTINGTON e SERGEANT, 2001). Nesta fase, os testes sorológicos como ELISA são utilizados para o diagnóstico, pois está

diretamente relacionado ao estágio da infecção. Segundo SHIN et al., (2004), durante a fase subclínica da paratuberculose, a resposta humoral está abaixo do limite de detecção. No momento em que ocorre a progressão da doença, com a apresentação clínica, a resposta humoral aumenta, sendo possível a detecção por testes sorológicos como ELISA. Por esse motivo, o uso de testes sorológicos se torna ineficiente para detectar anticorpos nos estágios iniciais da infecção (HARRIS e BARLETTA, 2001). Os testes sorológicos são indicados como testes de triagem e ainda para monitorar regiões onde a doença foi erradicada e deve ser mantida sob controle (SHIN et al., 2004).

Na paratuberculose, além dos testes sorológicos, os moleculares têm sido utilizados devido a praticidade e velocidade dos resultados (WATERS et al., 1999). A PCR tem sido usada para confirmar resultados de cultura positiva e para identificar MAP em fezes, leite, tecidos e sangue (GWOZDZ et al., 1997, 2000; CARVALHO et al., 2009). Tem se utilizado com êxito, diferentes locis, como o locus do gene *F57* (MOBIUS et al., 2008), *ISMav2* (STROMMENGER et al., 2001); e *IS900* sendo o mais utilizado devido ao número de cópias em relação aos demais (ENGLUND et al., 2002).

A imunopatologia da paratuberculose está associada com a inflamação crônica dos tecidos infectados, aos tipos celulares e a resposta imune presente no local da lesão que esta diretamente relacionada com as fases e a gravidade da doença (COUSSENS, 2004). As citocinas pró-inflamatória como IFN- γ , IL-2 e TNF- α são fundamentais para o recrutamento de células do sistema imunológico para combater a infecção, contudo, a ativação prolongada de citocinas pode desencadear uma sequência de eventos que pode resultar em danos no tecido e formação de lesões nos locais da infecção (CLARKE, 1997). Possivelmente em resposta aos danos causados pelas citocinas pró-inflamatória, as anti-inflamatórias como IL-10 se desenvolve para controlar os danos do tecido local e as respostas imunes nos locais da infecção (COUSSENS et al., 2004). Uma vez que os dois tipos de citocinas estejam presentes no mesmo momento nos locais da infecção, a resposta periférica observada iria depender das quantidades relativas das duas populações no sangue periférico em qualquer momento da infecção (DE SILVA et al., 2011).

A resposta imune no local da infecção é pouco definida e nesse sentido, a comparação da expressão de citocinas como as do sangue periférico podem ser

distintas durante o curso da paratuberculose e são influenciadas pelas fases da infecção (LEE et al., 2001; COUSSENS et al., 2004.; KHALIFEH e STABEL, 2004b; TANAKA et al., 2005). Normalmente os estudos avaliam a resposta imune de forma geral com a análise do sangue periférico (COUSSENS et al., 2002, 2004, 2005; BUZA et al., 2004 ; KOO et al., 2004).

Após a apresentação dos antígenos ao MHC classe II na superfície do macrófago, juntamente com a secreção IL-1, resulta na ativação de células T que produzem IL-2, que auxilia na expansão clonal das células T *helper* CD4 e CD8 citotóxicas. Após a ativação, as células T CD4 *naive*, podem se diferenciar em subpopulações de células Th1 ou Th2. Nas fases iniciais de infecção por MAP a diferenciação das células T CD4 é direcionada para células Th1, que irá desencadear a secreção de citocinas Th1, o IFN- γ , IL-2 e o TNF- α (BURRELLS et al., 1999;. STABEL, 2000a).

É geralmente aceito que o IFN- γ produzido pelas células Th1 é responsável pela restrição da multiplicação bacteriana na fase precoce da infecção (STABEL, 2000b; KARCHER et al., 2008). Também, desempenha um papel crucial na ativação de células T e macrófagos, maturação de células dendríticas, regulação positiva de MHC de classe I e II e produção de oxigênio reativo e nitrogênio por macrófagos (DELVIG et al., 2002; SHANKAR et al., 2003). Os macrófagos infectados ainda secretam TNF- α para induzir a morte dos micro-organismos através da geração de nitrogênio reativo intermediário e pela apoptose dos mesmos, consequentemente contribui para a redução de carga bacteriana (WEISS et al., 2008). Além de contribuir para o desenvolvimento de inflamações granulomatosas e caquexia dos animais (ADAMS e CZYPRYNSKI, 1995). As micobactérias patogênicas induz menor expressão de TNF- α em comparação com espécie não patogênica, as quais também induz níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatória, como IL-6 (BELTAN et al., 2000). Este é considerado um dos mecanismos que conduzem à eliminação rápida de espécies micobacterianas não patogênicas, enquanto que espécies patogênicas persistem uma vez que os níveis destes citocinas são mais baixos. O TNF- α desempenha um papel importante na inibição do crescimento de micobactérias *in vitro* (BASLER et al., 2010).

As células T CD4⁺ parecem ser a fonte primária de IFN- γ em infecções por MAP, contudo, células T CD8⁺ e $\gamma\delta$ também são produtoras de IFN- γ (BASSEY e COLLINS, 1997). A IL-2 é produzida predominantemente por células T CD4⁺ ativadas e células T CD8⁺ (MALEK, 2008). Além de agir sinergicamente com outras citocinas para induzir a expressão do IFN- γ , IL-1 α , TNF- α em células T e IL-4 em células B (MOSMANN e SAD, 1996). A progressão da doença em bovinos de assintomática a clínica tem sido associada com a diminuição de células T CD4⁺ e aumento das populações de células T $\gamma\delta$ e CD8⁺ na lâmina própria do íleo (KOETS et al., 2002; VALHEIM et al., 2004). Assim, a resposta específica das células T pode ser explorada para a detecção precoce da infecção enquanto que os ensaios baseados na resposta humoral são relevantes para detecção em fases posteriores da infecção (STABEL, 2000b).

Estudos têm relatado maior expressão de IFN- γ em PBMC e em tecidos de animais infectado com MAP nas fases iniciais de infecções naturais e experimentais em comparação com animais clinicamente infectados (COUSSENS et al., 2003, WATERS et al., 2003; KHALIFEH e STABEL, 2004a; TANAKA et al., 2005; STEWART et al., 2006). No entanto, podemos destacar descoberta recente que contrariam os dados acima discutidos, ROBINSON et al. (2011), analisaram a expressão de uma variedade de citocinas envolvidas na resposta imune, em linfonodos da região do jejuno de cervos infectados experimentalmente com MAP e observaram que os animais gravemente doente apresentaram uma elevada expressão de citocina pró-inflamatória, IFN- γ , IL-1 e IL-17, e uma reduzida resposta anti-inflamatória, IL-4, GATA-3, TGF- β , Foxp3.

A progressão da paratuberculose a partir de um estágio subclínico para o clínico está associada com uma diminuição da resposta imune Th1 para Th2. A produção de citocinas Th2 reguladoras, IL-4, IL-5 e IL-10 suporta uma resposta imune humoral caracterizada pela expansão de linfócitos B, secreção de imunoglobulinas e controle das respostas mediadas por células Th1 (MULLINS et al., 2001). A IL-4 e IL-10 são capazes de inibir as citocinas Th1, como o IFN- γ e IL-2 por agir em células apresentadoras de antígeno, suprimindo a função das células T e desativando os macrófagos e ainda a IL-4 suprime a produção de óxido nítrico nos macrófagos infectados (ALZUHERRI et al., 1996; LEE et al., 2001; KHALIFEH e STABEL, 2004b; TANAKA et al., 2005; ALLEN et al., 2011). Há poucas evidências que sugere um papel

específico para IL-4 na mediação da imunidade protetora contra MAP, tal como a sua expressão em tecidos não parece estar associados com o estado da infecção do animal (SWEENEY et al., 1998.; COUSSENS et al., 2004). No entanto, outros dois relatos têm demonstrado a expressão reduzida de IL-4 em PBMC de bovinos com infecção subclínica e clínica, em comparação com os animais controles após estimulação com MAP (COUSSENS et al., 2004; KARCHER et al., 2008). Enquanto isso, a IL-10 parece desempenhar um papel significativo nas infecções micobacterianas em geral, e especificamente durante a infecção por MAP. Uma regulação positiva de IL-10 nos tecidos, incluindo fígado, linfonodos mesentéricos e PBMC de bovinos e ovinos naturalmente infectados e apresentando a doença tem sido observada (COUSSENS et al., 2004;. KHALIFEH e STABEL, 2004b; SMEED et al., 2007). Contudo, novas descobertas demonstram que a atividade de IL-10 se inicia logo após a exposição ao MAP e com isso pode ser determinante na evolução da doença (DE SILVA et al., 2011).

Os ruminantes, hospedeiros naturais de MAP, são os mais indicados para ensaios experimentais, pois oferecem dados mais relevantes sobre a interação patógeno hospedeiro, no entanto, o longo período até o desenvolvimento dos sinais clínicos e o custo para a manutenção dos animais, torna o seu uso na pesquisa limitado. Em consequência disso, estudos com animais de laboratório têm sido explorado, são normalmente utilizados para diminuir os custos e, além disso, podem reproduzir a infecção em um curto período de tempo e os granulomas podem ser observados de três a seis semanas após a infecção (TANAKA et al., 1994; SHIN et al., 2006). Os camundongos representam o principal modelo, porém, algumas linhagens não reproduzem experimentalmente a infecção (HARRIS e BARLETTA, 2001). A resistência às infecções por micobactérias em camundongos, incluindo MAP, está associado com o locus Bcg no cromossomo 1 . Duas formas alélicas do gene *BCG*, a *Bcgs* e *Bcgr*, conferem susceptibilidade e resistência à infecção respectivamente. As linhagens C57BL/6 e BALB/c, têm o gene *Bcgs* e são suscetíveis a infecções por MAP. (TANAKA et al.,1994; VEAZEY et al.,1995; HARRIS e BARLETTA, 2001).

A dose de infecção e a via de administração são parâmetros importantes para o desenvolvimento da infecção em modelos experimentais. Inoculação oral de 10^{11} CFU por animal produz lesões granulomatosas em mais da metade dos animais, no entanto,

as lesões são limitadas à linfonodos mesentéricos (VEAZEY et al., 1995). Por outro lado, a IP de 10^6 CFU induz um pequeno número de granulomas epitelióides, em comparação com os granulomas multifocais compostos de macrófagos e células epitelióides que são observados após uma dose mais elevada 10^8 CFU (TANAKA et al., 2000). Dose de 10^8 UFC usando a inoculação IP e cepas virulenta de MAP normalmente produz resposta granulomatosa em três semanas pós-infecção (SHIN et al, 2006; WU et al, 2007). A inoculação IP produz um maior índice de infecção em comparação com outras rotas de inoculação (MUTWIRI et al., 1992). Inoculação de MAP em linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c confirmam que esses modelos são capazes de abrigar o bacilo nos tecidos do fígado e baço (CHIODINI et al., 1993; VEAZEY et al., 1995). Lesões típicas nos linfonodos mesentéricos, fígado e baço foram observados dois meses após inoculação de 10^8 UFC do agente (STABEL et al., 1996). Linhagem C57BL/6 tem sido usada como modelo para determinar à resposta imune de vacinas contra MAP (CHEN et al.,2008; PARK et al.,2008)

Além de todos os aspectos relacionados ao animal e a forma de administração do inóculo, a escolha da cepa é importante na obtenção de resultados. Quando se busca avaliar a relação agente e hospedeiro, é importante o uso de cepas com baixa passagem e relativa virulência (HINES et al., 2007), por exemplo a cepa MAP66115-98 de origem bovina (CHEN et al., 2008), cepa Linda e Ben de origem humana (ALLEN et al., 2011).

Normalmente a maioria dos estudos esta voltada para a análise da expressão de citocinas no sangue periférico, com isso, a resposta imune do hospedeiro é avaliada de forma generalizada e classifica em infecção clínica e subclínica e embora estes estudos sejam úteis no desenvolvimento de possíveis marcadores para diagnóstico, eles fornecem informações limitadas sobre a resposta do sistema imune no local da infecção. Desta forma, o estudo da resposta imune em relação à presença de MAP e lesões em órgão como: intestino (íleo e colón) e placa de Peyer que são definidos como sítios primários da infecção e órgão extra-intestinais como: fígado e baço, que possuem importância no desenvolvimento da doença sistêmica, poderão fornecer dados sobre a expressão de citocinas durante o curso da infecção e com o intuito de desenvolver conhecimentos da patofisiologia e imunopatogênese da paratuberculose.

3. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi verificar a resposta de citocinas pró e anti-inflamatória desenvolvida em camundongos C57BL/6 infectados experimentalmente com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em sítios intestinais e extra-intestinais em resposta ao agente.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar e quantificar a expressão relativa dos genes: *IL-2*, *IL-4*; *IL-10*; *INF-γ* e *TNF-α* em amostras (fígado, baço, íleo, colón e placa de Peyer) em períodos predeterminados após a inoculação.
- Associar a expressão do RNAm das citocinas com as lesões e a presença do micro-organismo nos órgãos nos períodos predeterminados (SCHWARZ, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Doenças Bacterianas (LDBAC) e de Biologia Molecular de Micro-organismos (BIOMOL), todos localizados no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os camundongos foram obtidos do Biotério (UFV) e mantidos no Infectório de Experimentação Animal (UFV). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA – UFV), sob o número do processo 91/2011.

4.1 – Animais

Foram utilizadas 28 fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 entre seis a oito semanas de idade, com peso entre 18g a 20g e padrão sanitário convencional (PARK et al., 2008; CHEN et al., 2008). Este número de animais foi definido pela análise estatística de amostragem (DELL et al., 2002). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em sete caixas de policarbonato microisoladoras (quatro animais por caixa) de aproximadamente 30x20x23cm, com cama de maravalha autoclavada, alocadas em estante com sistema de ventilação. Para adaptação ao novo ambiente, os animais foram mantidos por duas semanas no infectório antes do início do experimento. Durante o curso do experimento que foi de cinco meses, os camundongos tiveram livre acesso à alimentação e água. O ambiente da sala de experimentação possuía controle de temperatura (26^oC), ventilação e fotoperíodo. As limpezas das caixas foram realizadas semanalmente com solução de hipoclorito a 20% e álcool etílico a 70%, como também troca da cama, reposição de água e ração.

4.2 – *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* - cepa MAP66115-98

Uma cepa de MAP designada MAP66115-98, gentilmente cedida pelo Dr. Yung-Fu Chang, da Universidade de Cornell, EUA, foi usado para desafiar os camundongos.

Esta cepa foi cultivada em caldo Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC (ácido oléico, albumina bovina, dextrose e catalase) acrescido de 2 mg/l de micobactina *J* (Allied Monitor, Inc. Fayette, MO, EUA), à temperatura de 37°C durante um período de cinco semanas, onde se observou a turvação do meio inoculado comparado ao meio controle, sem o inóculo.

4.3 – Obtenção do inóculo

Transcorrido o tempo acima, a cultura foi quantificada utilizando o método comparativo de tubos da escala nefelométrica de McFarland (VERNA et al., 2007) correspondente ao tubo de número 1 (3×10^8 UFC) e confirmada em espectrofotômetro (BIOMATE™3 Spectrophotometer, Thermo Eletron Corporation) pela densidade óptica em comprimento de onda de 600nm ($DO_{600} = 0,197$ a $0,185$). Em seguida, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a $14000 \times g$ e o *pellet* lavado duas vezes em solução de PBS, pH 7,2.

4.4 – Bioensaio

Em cada um dos 20 camundongos foram inoculados 250µl de MAP66115-98 a 3×10^8 UFC/ml pela via IP no quadrante inferior direito do abdômen, em oito animais, controle negativo, foram inoculados com 250µl de PBS autoclavado. Na quarta, oitava, décima segunda e décima sexta semanas pós-inoculação, cinco animais inoculados e dois controles foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados. A eutanásia foi realizada pela administração de pentobarbital sódico na dose de 100mg/Kg pela via IP. Imediatamente após a eutanásia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e necropsiados. Para cada uma das amostras à serem coletadas, foi respeitada uma mesma sequência de coleta, onde após a abertura da cavidade abdominal. Coletou-se assepticamente as amostras dos órgãos na seguinte ordem: fígado, baço, Intestino (cólon, íleo) e placas de Peyer e foram armazenados em microtubos a -20°C para realização do teste molecular.

4.5 – Reação em Cadeia de Polimerase – PCR quantitativo

4.5.1– Extração de RNA

Para a extração de RNA tecidual, cada amostra dos órgãos conservados a -20°C foi separadamente envolta por papel alumínio e macerados por um pistilo. A extração foi realizada com Trizol[®] (*Life Technologies*) de acordo com as especificações do fabricante. Os fragmentos dos tecidos foram colocados em microtubos de 1,5 ml e adicionado 750 μL de Trizol[®] em seguida foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após foi adicionado 150 μL de clorofórmio (Sigma Aldrich) e as amostras foram homogeneizadas vigorosamente por 15 segundos com auxílio do votex, e incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 15 minutos a $12000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante contendo RNA foi recuperado (aproximadamente 500 μL) em microtubos novos de 1,5 ml estéreis e foi adicionado 380 μL de isopropanol (Sigma Aldrich), e mantidos em temperatura ambiente durante 10 minutos. Concluído este período, as amostras foram centrifugadas a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 750 μL de etanol 75% (v/v) (Sigma Aldrich) previamente armazenado a 4°C . Em seguida, foi centrifugado a $7500 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado, deixando-se o precipitado secar em temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente foi adicionado 20 μL de água tratada com *DEPC-treated Water* (Invitrogen). No último passo, as amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos. Após as amostras devidamente identificadas foram armazenadas a -20°C .

Na sequência foi realizada a quantificação do RNA total pelo método de fluorescência (Qubit[®] 2.0 Fluorometer) segundo as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada com a visualização dos fragmentos em eletroforese gel de agarose a 0.8% (Invitrogen, Washington, DC, EUA) em tampão TBE e visualizados pela incidência de UV.

4.5.2 – Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Invitrogen), de acordo com as

recomendações do fabricante. Em microtubos estéreis de 0,2 mL foi adicionado 300 ng de RNA total, 100 ng de *primer randômico hexamer* (Fermentas), 10mM da mistura de desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e 12 µL de água ultra pura, a mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e em seguida, submetida ao frio por 1 minuto. A seguir, foram adicionados 4µl de *5X First-Strand Buffer* (Invitrogen), 0,1 M DTT (Invitrogen), 40 unidades de *RNaseOUT™* (Invitrogen) e as amostras foram incubadas a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 unidades da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen), as amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos e a 37°C por 50 minutos e em seguida a reação foi inativada a 70°C por 15 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas -20°C.

4.5.3 – Reações de PCR quantitativo

Foram analisadas quintuplicatas biológicas dos órgão coletado em cada período de tempo previamente determinado após o desafio, para avaliar a expressão relativa dos genes IL-2, IL-4, IL-10, INF-γ e TNF-α. As reações foram realizadas em placas com 48 orifícios em duplicatas, no equipamento *Eco™ Real-Time PCR system* e foi utilizado o kit *Maxima® SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas), segundo o manual de instrução do fabricante. Os pares de oligonucleotídeos utilizados e suas respectivas concentrações seguem no quadro 1.

Para a realização do teste de PCR em tempo real foram utilizados 10 µl de *MIX* (2X); 1 µl de cada oligonucleotídeo na concentração inicial de 10µM; 7 µl de água *nuclease-free*, 1 µl de cDNA na concentração de, aproximadamente, 15 ng/µl, totalizando 20 µl por reação. As condições ótimas da PCR foram as seguintes: incubação por 2 minutos a 50°C, seguida de ativação da polimerase por 10 minutos a 95°C. Após este pré-tratamento, as amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições de termo-ciclagem: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 95°C por 15 segundos) para a geração da curva de *melting*. A análise desta curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se não havia a presença de bandas inespecíficas e ou dímero de oligonucleotídeos. A PCR em tempo

real foi realizada simultaneamente para os genes alvos *IL-2*, *IL-4*, *IL-10*, *INF-γ* e *TNF-α*, e para o controle endógeno (*β-actina*). Os resultados dos valores médios do Cts obtidos por duplicata foram utilizados para calcular a expressão gênica relativa dos genes alvos através do método comparativo utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

A análise estatística dos dados quantitativos foi realizada usando o programa *Graphpad Prism Software* versão 5 (GraphPad Software, Inc.). Os dados foram comparados usando uma análise simples de teste de variância Anova com teste de Bonferroni de comparação múltiplas como um pós-teste. O nível de significância adotado para os testes foi 5% (P<0,05).

Quadro 1- Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR quantitativo para os genes que codificam as citocinas estudadas.

Genes	Oligonucleotídeos sequência (5'-3')	Concentração final (nM)	Tamanho (pb)	Referência
<i>IL-2</i>	TCCAGAACATGCCGCAGAG	500	141	(Chen et al.,2008)
	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA			
<i>IL-4</i>	CTGACGGCACAGAGCTATTGA	500	216	Park et al.,2008)
	TATGCGAAGCACCTTGGAAGC			
<i>IL-10</i>	CAATAACTGCACCCACTTCCC	500	310	Park et al.,2008)
	GAGAAATCGATGACAGCGCCT			
<i>INF-γ</i>	CTGACGGCACAGAGCTATTGA	500	92	(Park et al.,2008)
	TATGCGAAGCACCTTGGAAGC			
<i>TNF-α</i>	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	500	175	(Chen et al.,2008)
	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA			
<i>β-actina</i>	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	500	349	(Yao et al.,2010)
	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC			

IL-2: Interleucina 2; IL-4: Interleucina 4; IL-10: interleucina 10; IFN-γ: Interferon gama; TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa; e *β-actina*: Beta actina.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se na maioria dos resultados uma regulação positiva nos perfis de expressões das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e TNF- α , e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 nos órgãos analisados dos camundongos infectados em relação aos controles durante todo o período do experimento, dezesseis semanas, como mostrado na tabela 1. Regulações negativas também foram observadas na quarta semana no baço e colón, na décima segunda no baço, íleo e placa de Peyer e na décima sexta semana no fígado, colón e íleo (Tabela 1). Diferenças estatísticas foram detectadas somente na oitava semana após o desafio no fígado (Figura 1A) para IFN- γ ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo, décima segunda e décima sexta semanas, no baço (Figura 1B e 1C) para IL-2 ($P < 0,001$) em relação ao controle negativo e a todos os demais períodos após o desafio e IFN- γ ($P < 0,01$) em relação ao controle negativo e décima segunda semana e $P < 0,05$ em relação à quarta semana, e no íleo (Figura 1D e 1E) para IL-4 ($P < 0,05$) em relação a quarta semana e ($P < 0,05$) ao controle negativo, décima segunda e décima sexta semanas e TNF- α ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo, décima segunda e décima sexta semanas após o desafio. Contudo, diferentes níveis de expressões também foram observados (Tabela 1), demonstrando com isso que os animais apresentaram uma resposta imunológica em todos os órgãos após o desafio com MAP mesmo com a ausência de lesões macro e microscópicas, mas na presença do agente na maioria das amostras (SCHWARZ, 2012).

Na quarta semana (Figura 2), após o desafio, não foi possível observar diferença estatística nas amostras analisadas, no entanto, foi possível identificar aumento dos níveis de transcritos de RNAm das citocinas estudadas. No fígado (Figura 2A), íleo (Figura 2C) e colón (Figura 2D) o IFN- γ apresentou maior nível de transcritos de RNAm em relação ao controle negativo, no entanto no baço (Figura 2B) os maiores níveis foram observados para a IL-10. As amostras das placas de Peyer na quarta semana não foram coletadas por motivos técnicos. Os resultados observados no fígado, íleo e colón eram esperados, visto que normalmente as expressões de IFN- γ , está presente na resposta imune mediada por célula apresentada na fase inicial da paratuberculose (BURRELLS et al., 1999;. STABEL, 2000a; SOHAL et al., 2008).

Tabela 1- Perfis de expressões das citocinas pro e anti-inflamatórias nos órgãos analisados nos quatro períodos do experimento.

Citocinas	Valor da expressão nos órgãos (vezes)					
	Fígado	Baço	Colón	Íleo	Placa de Peyer	
Controle negativo	IL-2	1,26	1,05	1,04	1,03	1,04
	IL-4	0,99	0,97	1,30	1,02	1,17
	IL-10	1,14	1,01	0,97	1,16	0,97
	IFN- γ	1,04	1,08	1,27	1,03	1,08
	TNF- α	1,00	1,09	0,99	1,07	1,05
4 Semanas	IL-2	3,21	3,18	1,76	3,02	ND
	IL-4	1,76	0,60	0,86	3,10	ND
	IL-10	4,61	4,58	0,75	3,05	ND
	IFN- γ	6,46	2,98	2,18	5,82	ND
	TNF- α	5,75	4,35	1,48	5,04	ND
8 Semanas	IL-2	3,37	22,88*	4,33	5,60	4,21
	IL-4	4,10	6,95	1,54	18,82*	5,43
	IL-10	7,90	3,86	6,58	2,90	1,39
	IFN- γ	15,48*	14,10*	3,88	6,52	1,17
	TNF- α	7,53	6,95	5,24	14,79*	2,45
12 Semanas	IL-2	2,53	2,76	4,63	5,72	2,03
	IL-4	3,60	0,50	5,12	0,37	7,02
	IL-10	6,77	0,36	3,19	1,47	1,35
	IFN- γ	3,24	1,19	2,39	0,81	0,63
	TNF- α	6,01	2,57	10,48	0,33	2,85
16 Semanas	IL-2	0,37	1,33	0,30	3,64	1,83
	IL-4	2,72	1,72	1,01	0,83	2,27
	IL-10	4,90	5,45	3,92	3,05	1,92
	IFN- γ	3,14	7,30	2,38	3,71	1,09
	TNF- α	4,80	4,54	0,96	1,11	4,31

IL-2: Interleucina 2; IL-4: Interleucina 4; IL-10: interleucina 10; IFN- γ : Interferon gama; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; ND: Amostras não definida; *: diferença estatística significativa.

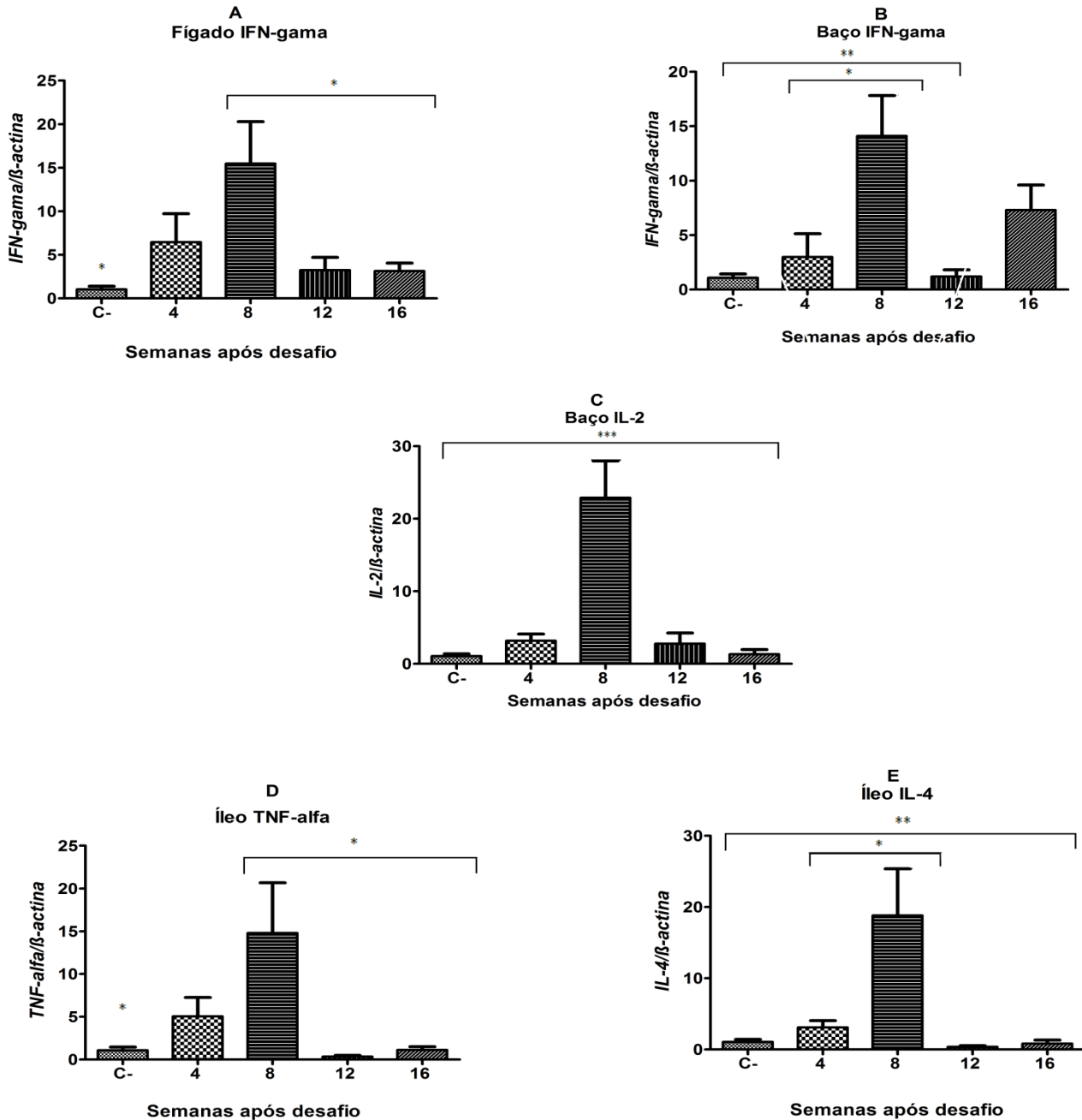


Figura 1- Diferença estatística significativa apresentada pela expressão relativa dos transcritos de RNA das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α na oitava semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98. As diferenças significativas são indicadas como segue: ***, 0,1% ($P < 0,001$), **, 1% ($P < 0,01$) e *, 5% ($P < 0,05$). **(A)** Transcritos de RNAm do *IFN- γ* no fígado. **(B)** Transcritos de RNAm do *IFN- γ* no baço **(C)** Transcritos de RNAm do *IL-2* no baço. **(D)** Transcritos de RNAm do *TNF- α* no íleo **(E)** Transcritos de RNAm da *IL-4* no íleo.

Estudos têm relatado maior expressão de IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico de bovinos infectados com MAP (COUSSENS et al., 2003, 2004;.

KHALIFEH e STABEL, 2004a), correlacionando estes níveis no início da infecção e estágio subclínicos em bovinos, quer se trate de infecção natural ou experimental (STABEL, 2000a; WATERS et al., 2003; KHALIFEH e STABEL, 2004a; STEWART et al., 2006).

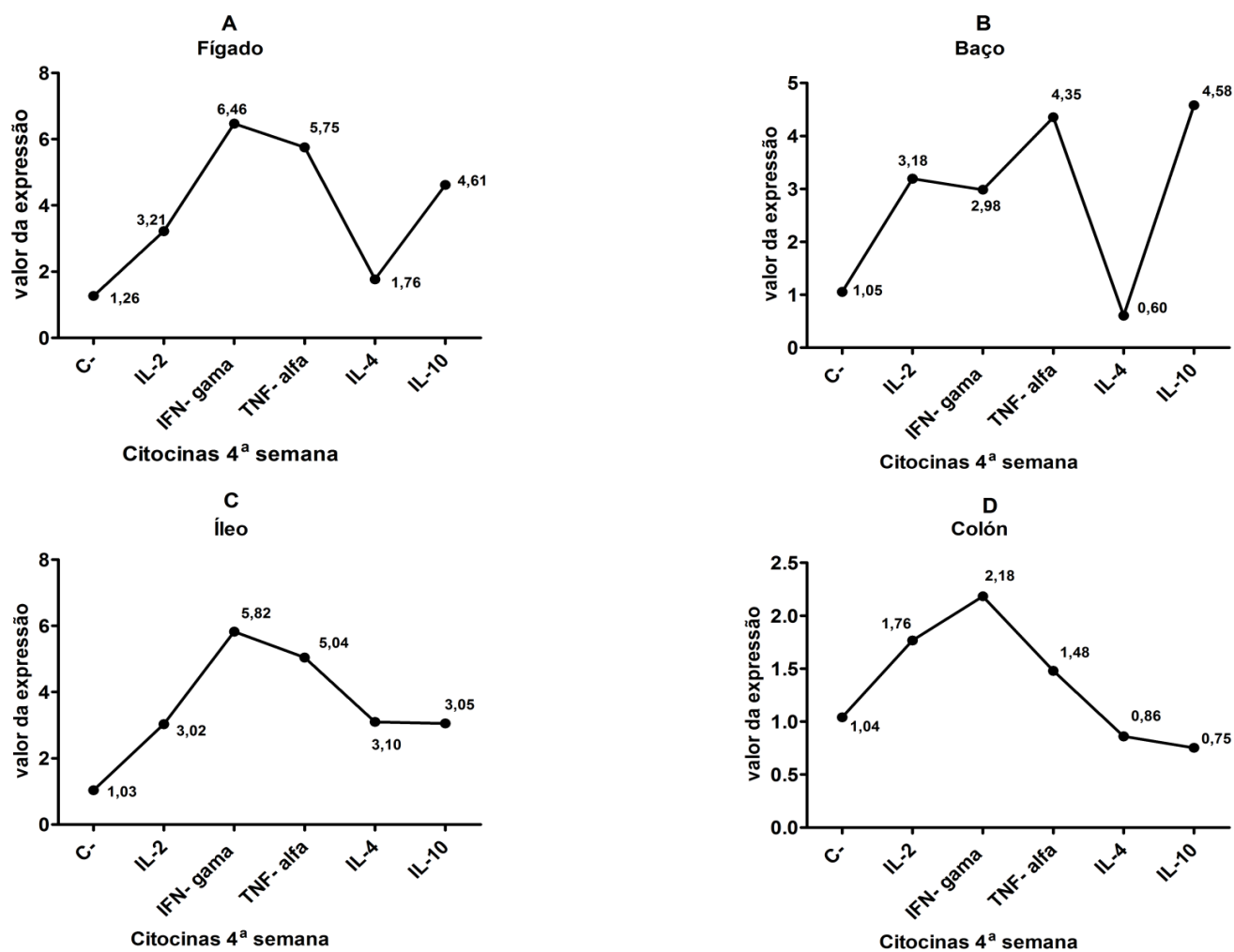


Figura 2- Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na quarta semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98. **(A)** Citocinas Th1 e Th2 no fígado **(B)** Citocinas Th1 e Th2 no baço **(C)** Citocinas Th1 e Th2 no íleo **(D)** Citocinas Th1 e Th2 no colón.

No baço, contudo o aumento dos níveis de IL-10 não era esperado, pois esta é uma citocina Th2 relacionada com a evolução da paratuberculose para o estágio clínico, no entanto estudos recentes, realizados por DE SILVA et al., (2011) ao

analisarem sangue periférico de carneiros verificaram que a secreção de IL-10 no sangue periférico de animais expostos ao MAP foi significativamente mais elevada do que em animais controle, tão cedo quanto quatro meses após a inoculação, e aumentou progressivamente. Uma elevação semelhante de IL-10 ocorreu no sangue periférico de bezerros duas semanas após exposição a uma dose elevada (10^{10} organismos) de MAP (NAGATA et al., 2010).

Somente na oitava semana (Figura 3), foi possível observar diferença estatística significativa para a citocina IFN- γ , em amostras do fígado e baço, para o TNF- α e IL-4 no íleo e para a IL-2 no baço. Os maiores níveis de transcrito de RNAm foram observados no fígado, para o IFN- γ , no baço para a IL-2, no íleo e placa de Peyer para a IL-4 e no colón para a IL-10. Normalmente a expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-2 estão presentes na resposta imune mediada por célula apresentada na fase inicial da paratuberculose (BURRELLS et al., 1999;. STABEL, 2000a). Em contraste, com os resultados observados neste trabalho, CHEN et al.,(2008), com o objetivo de analisar resposta imune produzida por vacina anti-MAP em camundongos C57BL/6 não identificaram diferenças significativa para a expressão de IL-2 em células de baço de animais imunizados e no controle não imunizados. Os resultados observados no presente estudo também não corroboram com os resultados observados em outras pesquisas em que expressão dos transcritos de RNA do TNF- α em tecidos do íleo não pareceu ser afetada pela infecção por MAP, por não apresentar diferença estatística significativa nas amostras analisadas (LEE et al.,2001; COUSSENS et al., 2004; TANAKA et al., 2005; ROBINSON et al., 2011). Esses resultados podem ajudar a explicar a natureza difusa de granulomas nos locais de infecção observados nos estudos acima, uma vez que o TNF- α é necessário para a formação adequada de granulomas bem definidos (EHLERS et al., 2000; ROACH et al., 2002). Entretanto, apesar da diferença significativa estatística observada na expressão do *TNF- α* no íleo, não foi observada alterações macroscópicas e microscópicas que indicassem formação de granulomas no íleo em nenhum dos períodos após o desafio (SCHWARZ, 2012). A ausência de granulomas pode esta relacionada ao período de experimento (16 semanas), a dose de inóculo usada (3×10^8 UFC), e também a reduzida expressão do TNF- α observada na fase final após a inoculação. Contudo, VEAZEY et al., (1995), em

um estudo utilizando a mesma via de inoculação e linhagem de camundongos, e dose de inóculo 1×10^9 UFC constataram presença de granulomas no fígado, pulmão e linfonodos mesentéricos aos 15 dias pós-inoculação.

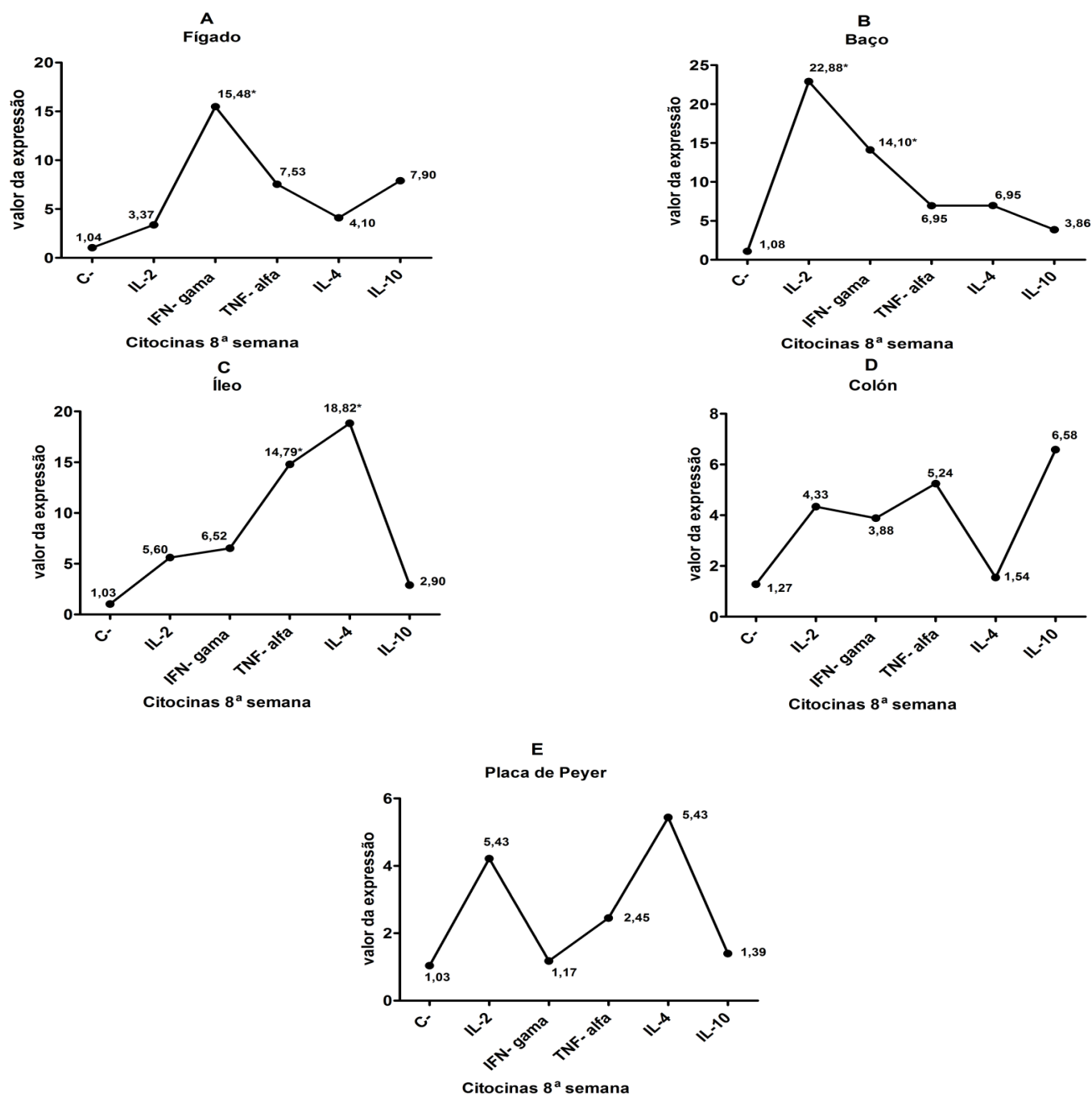


Figura 3- Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na oitava semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98. **(A)** Citocinas Th1 e Th2 no fígado **(B)** Citocinas Th1 e Th2 no baço **(C)** Citocinas Th1 e Th2 no íleo **(D)** Citocinas Th1 e Th2 no colón **(E)** Citocinas Th1 e Th2 na placa de Peyer.

Os resultados obtidos no presente estudo quanto a expressão da IL-4 não corroboram com resultados de estudos anteriores que sugerem poucas evidências para uma função específica da IL-4 na mediação da imunidade protetora contra MAP, tal como a expressão em tecidos não parece estar associada ao estado da infecção dos animais (SWEENEY et al., 1998.; COUSSENS et al., 2004). E ainda pode-se destacar outros estudos que concluem que a expressão de IL-4 elevada está normalmente relacionada com a evolução da paratuberculose para o estágio clínico como foi observado por TANAKA et al., (2005) na análise de linfonodos da região do íleo de animais com lesões lepromatosas (3,50 vezes) que na fase tardia da infecção apresentou expressão significativamente maior em comparação com lesões tuberculosas (0,4 vezes) encontrada na fase inicial e no controle negativo (0,80 vezes). Todavia, ROBINSON et al., (2011), observaram ao analisarem gânglios linfáticos da região do jejuno de cervos severamente doentes, baixa expressão significativa de IL-4 em comparação a animais minimamente doentes e controle negativo.

Na décima segunda semana (Figura 4) após o desafio, os maiores níveis de transcrito de RNA foram observados no fígado para a IL-10, no baço e íleo para a IL-2, no colón para o TNF- α e na placa de Peyer para a IL-4. COUSSENS et al., (2004) ao analisarem linfonodos mesentéricos de drenagem dos locais de infecção por MAP em bovino naturalmente infectados, identificaram expressões de TNF- α semelhantes aos animais não infectados e níveis mais elevados de IL-2 nos animais infectados em comparação aos controles. Da mesma forma, TANAKA et al., (2005) não encontram diferença estatística significativa na expressão do TNF- α nos linfonodos da região do íleo entre animais com lesões tuberculosa (fase inicial da infecção), lesões lepromatosas (fase final da infecção) e não infectados, mas foi possível observar maiores níveis de expressão nos não infectados seguido do grupo com lesões lepromatosas e tuberculosas. Portanto, pode-se inferir com esses resultados que ocorre um aumento no nível de expressão da IL-2 nos locais da infecção em animais infectados com MAP. COUSSENS et al., (2004) encontraram expressão reduzida de IL-4 em PBMC de bovinos em estágio subclínico e clínico, em comparação aos controles.

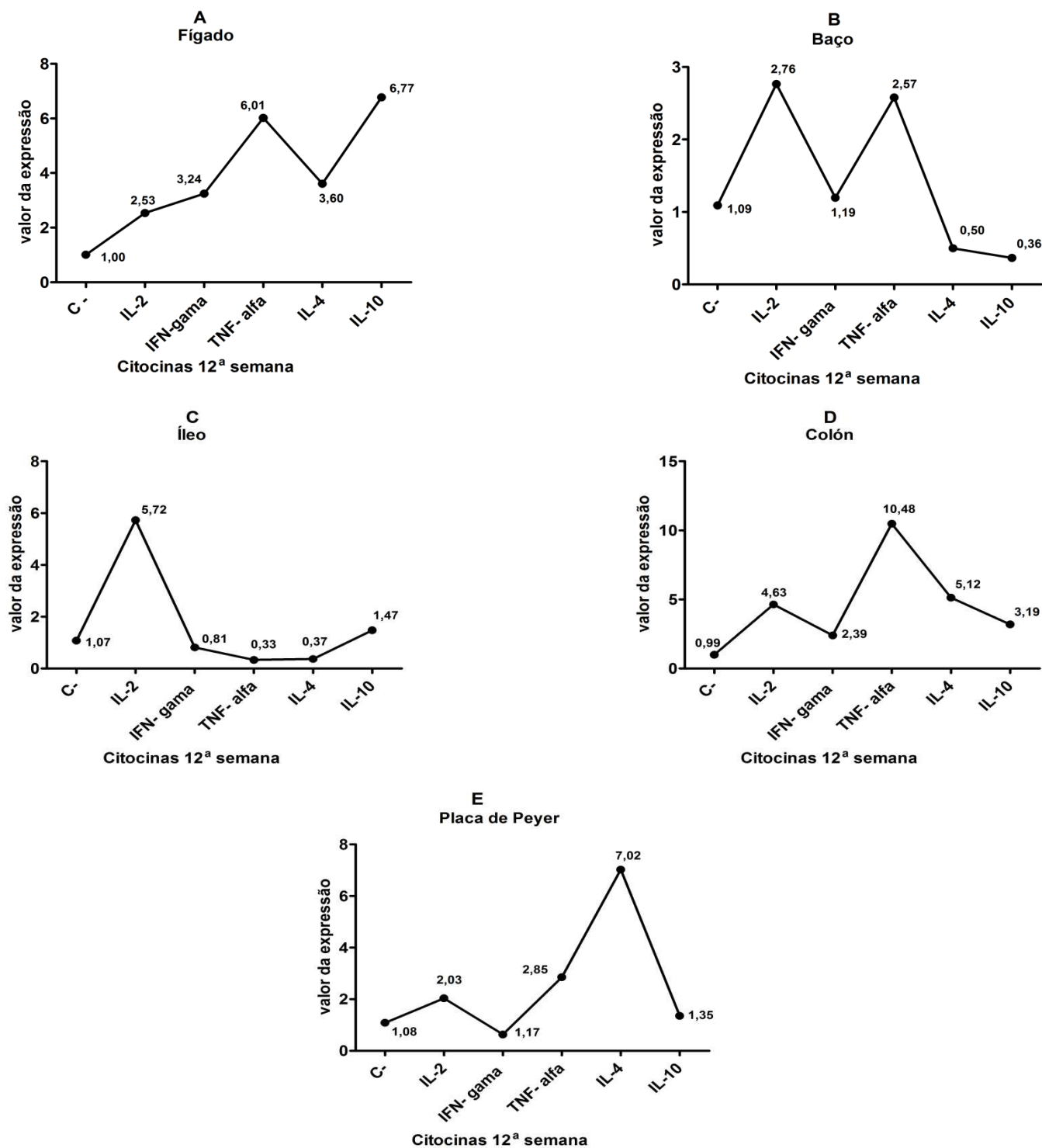


Figura 4- Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na décima segunda semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98. **(A)** Citocinas Th1 e Th2 no fígado **(B)** Citocinas Th1 e Th2 no baço **(C)** Citocinas Th1 e Th2 no íleo **(D)** Citocinas Th1 e Th2 no colón **(E)** Citocinas Th1 e Th2 na placa de Peyer.

A IL-4 esta normalmente associada à fase clínica da paratuberculose, com isso o aumento da expressão no colón de camundongos que não apresentaram sinais de infecção segundo SCHWARZ, (2012) não era esperado. No mesmo sentido, SWEENEY et al., (1998), ao analisarem a expressão do gene *IL-4* de gânglios linfáticos do ceco de bovinos com paratuberculose nos estádios subclínica, clínica e no controle, também não observaram diferença significativa entre os grupos.

Os resultados observados para IL-10 são inesperados, pois nos sítios primários típicos da infecção natural por MAP, a expressão da IL-10 esta relacionada com a progressão da paratuberculose para um quadro clínico. Esta afirmação foi demonstrada por, KHALIFEH e STABEL, (2004b) que ao analisarem amostras de íleo e linfonodos mesentéricos de bovinos infectados naturalmente, a expressão dos transcritos de RNA da IL-10 foi elevada em animais com doença clínica, mas não em animais saudáveis ou com a doença subclínica. Possivelmente os resultados observados no sangue periférico de animais infectados estão ligados às respostas imunológicas que ocorrem nos locais específicos da infecção por MAP.

A regulação positiva observada na expressão dos transcritos de RNA da IL-4 na placa de Peyer não era esperada, pois a referida citocina anti-inflamatória normalmente esta relacionada com a paratuberculose clínica, como observado por KARCHER et al., (2008), um maior nível de secreção em PBMC em bovinos em estágio clínico em comparação com animais em estágio subclínico e no controle.

Na décima sexta semana (Figura 5) após o desafio os maiores níveis de transcrito de RNAm foram observados no fígado e colón para a IL-10, no baço e íleo para o IFN- γ e na placa de Peyer para o TNF- α . Em bovinos na fase subclínica da paratuberculose ocorre, aumento da expressão de IFN- γ no local da infecção como tecido do íleo (SWEENEY et al.,1998) e também em células mononucleares do sangue periférico de animais infectados naturalmente (STABEL, 2000a). A progressão da doença para o estado clínico em animais infectados naturalmente, ocasiona declínio da produção de IFN- γ tanto no local da infecção quanto no sangue periférico (STABEL, 1996; SWEENEY et al.,1998; STABEL, 2000a). No entanto, durante o período do experimento não foi possível observar a regulação negativa na expressão do IFN- γ , mas caso o experimento se prolongasse por um período maior, talvez fosse possível

observar o mesmo comportamento observado pelos autores citados. O IFN- γ esta relacionada com a resposta inicial ao MAP como foi observado na pesquisa de KHALIFEH e STABEL, (2004b) que ao analisarem amostras de íleo, junção ileocecal, linfonodos mesentéricos e linfonodos ileocecal de bovinos saudáveis e infectados, em fases clínica e subclínica da doença, observaram que os níveis de RNAm de IFN- γ são mais elevados em animais com doença subclínica em comparação com animais saudáveis e que evoluíram para o estágio clínico. No entanto, ROBINSON et al.,(2011) ao analisarem gânglios linfáticos da região do jejuno de cervos infectados experimentalmente demonstraram que a expressão de RNAm de IFN- γ , foi significativamente maior em animais severamente doentes em comparação a animais minimamente doentes e controle negativo. Expressões elevadas de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ podem estar relacionadas com o grau de inflamação no intestino de animais doentes que é característico da paratuberculose (CLARKE et al.,1997), mas isto não foi observado em nenhuma das amostras analisadas (SCHWARZ, 2012).

Normalmente a expressão da IL-10 nos locais da infecção pelo MAP como o íleo esta relacionada com progressão da paratuberculose para o quadro clínico, desta forma os resultados do presente estudo não corroboram com os obtidos por SMEED et al., (2007) e TANAKA et al., (2005) que observaram elevada expressão da referida citocina em linfonodos da região do íleo de animais com lesões multibacilares (fase tardia da infecção) quando comparado com animais paucibacilares (fase inicial da infecção) e não infectados. O espectro da doença nestes animais variou entre ter a doença clínica (SMEED et al., 2007) para ausência de doença clínica, mas sendo positivo para presença de anticorpo ou cultura fecal (TANAKA et al., 2005).

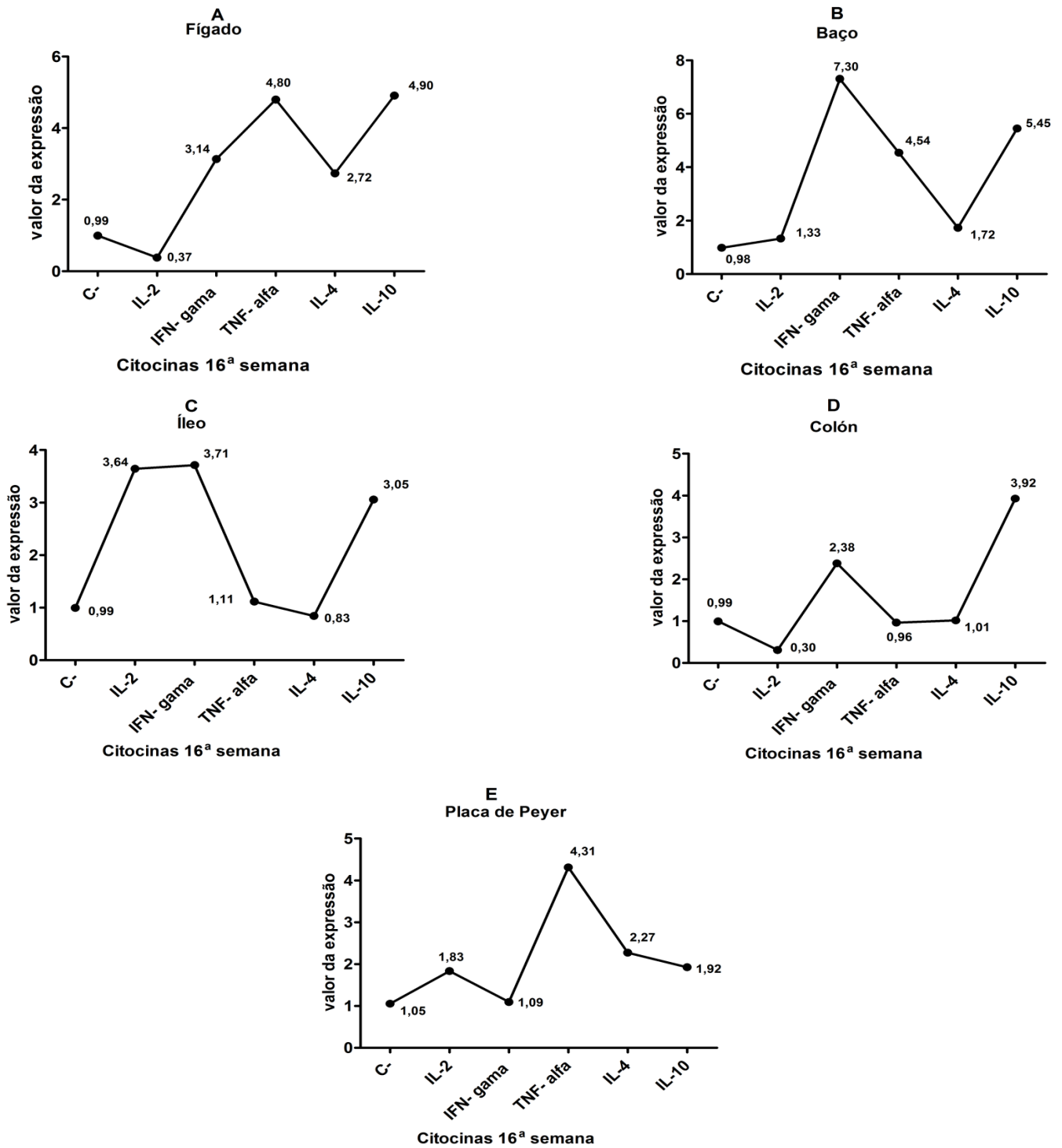


Figura 5- Expressão relativa das citocinas padrão Th1 e Th2 na décima sexta semana após o desafio com MAP cepa MAP66115-98. **(A)** Citocinas Th1 e Th2 no fígado **(B)** Citocinas Th1 e Th2 no baço **(C)** Citocinas Th1 e Th2 no íleo **(D)** Citocinas Th1 e Th2 no colón **(E)** Citocinas Th1 e Th2 na placa de Peyer.

Os níveis de expressão das citocinas pró e anti-inflamatória, estudadas no baço e no fígado eram esperados, apesar de que normalmente nos hospedeiros naturais de MAP estes órgãos não são tidos com sítios primários da infecção (GWOZDZ et al., 2000). Estudos têm demonstrado que fígado e baço são preferencialmente acometidos quando se tem uma infecção disseminada induzida pela inoculação IP (CHEN et al., 2008; BEGG e WHITTINGTON, 2008; PARK et al., 2008)., e ainda órgãos linfóides como o baço tem grande relevância na resposta ao antígeno. Além disso, SCHWARZ em 2012, trabalhando com os mesmos camundongos verificou as maiores quantidades de marcação positiva pela técnica de *nested*-PCR no baço 27,9% (17/20) e fígado 19,7% (12/20). Inferi-se que a presença do micro-organismo detectado pela técnica molecular induziu expressão das citocinas estudadas, mesmo sem causar infecção, pois não se observam alterações histológicas pela coloração de HE em nenhuma das amostras analisadas.

Os resultados dos níveis de expressões dos transcritos de RNAm demonstrados no colón, íleo e placa de Peyer, eram previstos, mas em menor intensidade, pois, apesar de que normalmente em infecções por MAP nos hospedeiros naturais, estes locais são definidos como alguns dos sítios primários da infecção, BEGG e WHITTINGTON (2008) observaram lesões e presença do antígeno em tecidos intestinais em apenas alguns casos após a inoculação IP em infecções experimentais. Corroborando com os resultados acima, SCHWARZ, (2012) não identificou nas amostras destes órgãos dos camundongos destinadas a histologia alterações que indicassem lesões, no entanto, foi possível observar marcações positiva para técnica de ZN, BAAR, em apenas duas amostras de placas de Peyer de dois animais, uma coletada na décima segunda e a outra na décima sexta semanas pós-inoculação. Além disso, pela técnica de *nested*-PCR foi possível observar a presença de MAP no cólon 24,6%, íleo 18,0% e placas de Peyer 9,8%, sendo esta ultima em apenas duas amostras positiva em cada período estudado. Contudo, no presente estudo foi observado níveis de expressão no colón e íleo semelhantes aos observados no fígado e baço, com exceção na placa de Peyer, talvez o qual justificado pela pequena quantidade de amostras positivas pela técnica de *nested*-PCR.

Esperava-se que o baço e fígado apresentassem maiores níveis de expressão de transcritos de RNAm das citocinas analisadas em relação aos demais órgãos. Contudo, o cólon e o íleo, também obtiveram altos valores de expressão. Em relação ao tipo de expressão das citocinas era esperado regulação positiva para as citocinas pró-inflamatórias durante todo o período do experimento e baixa ou negativa para as anti-inflamatórias, mas foi possível observar também uma alta regulação positiva para as citocinas anti-inflamatórias em todos os órgãos analisados durante o período do experimento.

Com os resultados apresentados neste estudo pode-se inferir que o perfil de expressão das citocinas em órgãos de camundongos inoculados com MAP é complexo, no caso os hospedeiros responderam expressando transcritos de RNA de citocinas pró e anti-inflamatórias tanto nas fases precoces quanto nas finais após a inoculação na ausência de lesões, mas na presença de MAP na maioria das amostras analisadas. Além disso, foi possível observar os maiores níveis de expressão para as citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α na oitava semana, ou seja, no final da fase inicial após a inoculação. Os maiores níveis de expressão dos transcritos de RNAm observados para as citocinas Th1 em relação as Th2 e a resistência ao desenvolvimento da infecção por MAP possivelmente esta relacionada à resposta preferencialmente Th1 produzida pelos camundongos C57BL/6 e ainda a ação antagonista que as citocinas Th1 exercem sobre as citocinas Th2 (MOSMANN et al., 1986). Uma possível explicação para a presença destas citocinas desde as fases iniciais da paratuberculose foi proposto por COUSSENS et al., (2004) onde uma população de células pró-inflamatória se desenvolve nos locais da infecção e nos linfonodos de drenagem e uma população anti-inflamatória, talvez expressando IL-10 de uma maneira antígeno específica, também se desenvolve para possivelmente controlar os danos teciduais e as respostas imunes gerada pela ação das citocinas pró-inflamatórias nos locais da infecção.

Com estes resultados, espera-se uma melhor compreensão da expressão de citocinas pró e anti-inflamatória em diferentes tempos pós-inoculação nos locais da infecção tanto em órgãos tidos como sítio específicos de MAP quanto em órgãos extra-intestinais. Assim, eles possam servir de suporte para futuras pesquisas que busquem o melhor entendimento da imunopatogênese nos locais da infecção e com isso auxiliar

no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que utilizem a dosagem de citocinas no sangue periférico para detectar precocemente animais infectados por MAP auxiliando na prevenção e controle da paratuberculose.

8. CONCLUSÃO

✓ Os camundongos inoculados IP com MAP responderam produzindo tanto transcritos de RNA de citocinas pró e anti-inflamatória durante o período do experimento.

✓ No fígado os maiores níveis de transcritos de RNA na quarta e oitava semanas foram do IFN- γ , e na décima segunda e sexta semanas para a IL-10.

✓ No baço os maiores níveis de transcrito de RNA foram observados na quarta semana para IL-10, na oitava semana para IL-2 que apresentou diferença estatística significativa, e para o TNF- α e IFN- γ na décima segunda e décima sexta semanas respectivamente.

✓ No colón não foi observada diferença estatística significativa, mas os maiores níveis de transcritos de RNA foram observados na quarta, oitava, décima segunda e décima sexta semanas para o IFN- γ , IL-10, TNF- α e a IL-10 respectivamente.

✓ O íleo apresentou os maiores níveis de transcritos de RNA na quarta semana para o IFN- γ na oitava semana a IL-4 e o TNF- α demonstraram diferenças estatística, na décima segunda semana a IL-2 e na décima sexta semana o IFN- γ .

✓ Na placa de Peyer os maiores níveis de transcritos de RNA na oitava semana e na décima segunda foram da IL-4 e na décima sexta semana foi TNF- α .

✓ Na oitava semana após a inoculação foi observado os maiores níveis de expressão para as citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α .

✓ A resposta das citocinas Th1 e Th2 é complexa e independente da presença de lesões, mas pode depender da presença do agente.

9. REFERÊNCIAS

- ACYPRESTE, C. S.; JULIANO, R. S.; RIVEIRA, F. E. B.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANT, M. C. S.; DIAS FILHO, F. C. Uso da técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em vacas em lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n.1, p.55-59, 2005.
- ADAMS, J. L.; CZYPRYNSKI, C. J. Ex vivo induction of TNF- α and IL-6 mRNA in bovine whole blood *Mycobacterium paratuberculosis* and mycobacterial cell wall components. **Microbial Pathogenesis**, v.19, p. 19–29,1995.
- ALLEN, A. J.; PARK, K. T.; BARRINGTON, G. M.; LAHMERS, K. K.; ABDELLRAZEQ, G. S.; RIHAN, H. M.; SREEVATSAN, S.; DAVIES, C.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W. C. Experimental infection of a bovine model with human isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, p. 258–266, 2011.
- ALZUHERRI, H. M.; WOODALL, C. J.; CLARKE, C. J. Increased intestinal TNF- α , IL-1 beta and IL-6 expression in ovine *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 49, p. 331–345, 1996.
- ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; GEIJO, M.; VAZQUEZ, P.; SEVILLA, I.; GARRIDO, J. M.; JUSTE, R. A. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *para-tuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. **Foodborne Pathogens and disease**, v.6, p.513–518, 2009.
- ALONSO-HEARN, M.; PATEL, D.; DANELISHVILI, L.; MEUNIER GODDIK, L.; BERMUDEZ, L. E. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP3464 gene encodes an oxidoreductase involved in invasion of bovine epithelial cells through the activation of host cell Cdc42. **Infection and Immunity**, v. 76, p.170–178, 2008.
- ANTOGNOLI, M. C.; GARRY, F. B.; HIRST, H. L.; LOMBARD, J. E.; DENNIS, M. M.; GOULD, D. H.; SALMAN, M. D. Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.300–308, 2008.
- BASLER, T.; HOLTMANN, H.; ABEL, J.; ECKSTEIN, T.; BAUMER, W.; VALENTIN-WEIGAND, P.; GOETHE, R. Reduced transcript stabilization restricts TNF- α expression in RAW264.7 macrophages infected with pathogenic mycobacteria: evidence for an involvement of lipomannan. **Journal of Leukocyte Biology**, v.87, p.173–183, 2010.
- BASSEY, E. O. E.; COLLINS, M. T. Study of T-Lymphocyte subsets of healthy and *M. paratuberculosis* infected cattle. **Infection and Immunity**, v. 65, p.4869-4872, 1997.

BEGG, D. J.; WHITTINGTON, R. J. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **The Veterinary Journal**, v. 176, p.29–145, 2008.

BELTAN, E.; HORGAN, L.; RASTOGI, N. Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.28, p.313–318, 2000.

BENEDICTUS, G.; VERHOEFF, J.; SCHUKKEN, Y. H.; HESSELINK, J. W. Dutch paratuberculosis program me history, principles and development. **Veterinary Microbiology**, v.77, p. 399–413, 2000.

BENEDICTUS, A.; MITCHELL, R. M.; LINDE-WIDMANN, M.; SWEENEY, R. W.; FYOCK, T. L.; SCHUKKEN, Y. H.; WHITLOCK, R. H. Calculation of transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in a dairy herd going through a control program. **Preventive Veterinary Medicine**, v.83, p.215–227, 2008.

BURRELLS, C.; CLARKE, C. J.; COLSTON, A.; KAY, J. M.; PORTER, J.; LITTLE, D.; SHARP, J. M. Interferon- gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p.139–148, 1999.

BUSH, R. R.; WINDSOR, P. A.; TORIBIO, J. A. Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. **Australian Veterinary Journal**, v.84, n.7, p.246-253, 2006.

BUZA, J. J.; HIKONO, H.; MORI, Y.; NAGATA, R.; HIRAYAMA, S.; AODON-GERIL; BARI, A. M., SHU, Y.; TSUJI, N. M.; MOMOTANI, E. Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in experimentally infected cattle with paratuberculosis. **Infection and Immunity**, v.72, p.2425–2428, 2004.

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

CHEN, L. H.; KATHAPERUMAL, K.; HUANG, C. J.; MCDONOUGH, S.P.; STEHMAN, S.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; BANNANTINE, J. P.; CHANG, C. F; CHANG, Y. F. Immune responses in mice to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* following vaccination with a novel 74F recombinant polyprotein. **Vaccine**, v.26, p.1253-1262, 2008.

CHIODINI, R. J.; BUERGELT, C. D. Susceptibility of Balb/c, C57/B6 and C57/B10 mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.109, p 309-319, 1993.

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

COCITO, C.; GILOT, P.; COENE, M.; KESEL, M.; POUPART, P.; VANNUFFEL, P. Paratuberculosis. **Clinical microbiology reviews**, v.7, p.328-345, 1994.

COSTA, J.C.M.; PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; ESPESCHIT, I.F.; FELIPPE, A.G.; SANTOS, G.M.; TOBIA, F.L.; SILVA JUNIOR, A.; MOREIRA, M.A.S. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1491-1494, 2010.

COUSSENS, P. M.; COLVIN, C. J.; WIERSMA, K.; ABOUZIED, A.; SIPKOVSKY, S. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Infection and Immunity**, v, 70, p.5494– 5502, 2002.

COUSSENS, P. M.; COLVIN, C. J.; ROSA, G. J.; PEREZ, L. J.; ELFTMAN, M. D. Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. **Infection and Immunity**, v. 71, p.6487–6498, 2003.

COUSSENS, P.M. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. **Infection and Immunity**, v.72, p.3089-3096, 2004.

COUSSENS, P. M.; VERMAN, N.; COUSSENS, M. A.; ELFTMAN, M. D.; MCNULTY, A. M. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1409–1422, 2004.

DELL, R.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample size determination. **ILAR Journal**, v. 43, p.207-213, 2002.

DELVIG, A. A.; LEE, J. J.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M.; ROBINSON, J. H. TGF-beta1 and IFN-gamma cross-regulate antigen presentation to CD4 T cells by macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, p. 163–166, 2002.

De SILVA, K.; BEGG, D.; WHITTINGTON, R. The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 139, p. 10–16, 2011

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.

DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES, M. J. P.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 109-115, 1999.

ENLUND, S.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, n.2, p.267-271, 2002.

EHLERS, S.; KUTSCH, S.; EHLERS, E. M.; BENINI, J.; PFEFFER, K. Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55/ mice is dependent on T cells and IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 165, p.483–492, 2000.

EISENBERG, S. W. F.; KOETS, A. P.; NIELEN, M.; HEEDERIK, D.; MORTIER, R.; DE BUCK, J.; ORSEL, K. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Veterinary Research**, v.42, n. 117, p.1-8, 2011.

EPPELSTON, J.; WHITTINGTON, R. J. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. **Australian Veterinary Journal**, v.79, p.776–777, 2001.

FELLER, M.; HUWILER, K.; STEPHAN, R.; ALTPETER, E.; SHANG, A.; FURRER, H.; PFYFFER, G. E.; JEMMI, T.; BAUMGARTNER, A.; EGGER, M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases Infect**, v.7, p. 607–613, 2007.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W. Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, n.4, p.19-24, 2001.

FONSECA, L. F.; OLIVAL, A. A.; PEREIRA, C. C.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN L. J.; SANTOS, M. V. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.51-56, 2000.

GOMES, M. J. P.; DRIEMEIER, D.; RIBEIRO, V. R.; WUNDER JR, E. A.; ASANOME, W.; LANZON, L. F.; WALD, V. B. Doença de Johne: isolamento do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) em um rebanho leiteiro infectado na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 2, p.113-118, 2002.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2428-35, 2002.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; NEILL, S. D.; ROWE, M. T. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.2, p.631-6,1996.

GRANT, I.R. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 1282–1293, 2005.

GREENSTEIN, R. J. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. **Lancet Infectious Diseases Infect**, v. 3, p. 507–514, 2003.

GWOZDZ, J. M.; REICHEL, M. P.; MURRAY, A.; MANKTELOW, W.; WEST, D. M.; THOMPSON, K. G. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.57, p.233–244, 1997.

GWOZDZ, J. M.; THOMPSON, K. G.; MURRAY, A.; WEST, D. M.; MANKTELOW, B. W. Use of the polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in blood and liver biopsies from experimentally infected sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.78, p. 622–624, 2000.

HINES, M. E.; STABEL, J. R.; SWEENEY, R. W.; GRIFFIN, F.; TALAAT, A. M.; BAKKER, D.; BENEDICTUS, G.; DAVIS, W. C.; DE LISLE, G. W.; GARDNER, I. A.; JUSTE, R. A.; KAPUR, V.; KOETS, A.; MCNAIR, J.; PRUITT, G.; WHITLOCK, R. H. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p.197–222, 2007.

HARRIS, N. B.; BARLETA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical microbiology Reviews**, v.14, p. 489-512, 2001.

KARCHER, E. L.; BEITZ, D. C.; STABEL, J. R. Modulation of cytokine gene expression and secretion during the periparturient period in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 277–288, 2008.

KHALIFEH, M. S.; STABEL, J. R. Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. **Infection and Immunity**, v. 72, p.1974–1982, 2004a.

KHALIFEH, M. S.; STABEL, J. R. Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.99, p.39–46, 2004b.

KOETS, A.; RUTTEN, V.; HOEK, A.; VAN MIL, F.; MULLER, K.; BAKKER, D.; GRUYS, E.; VAN EDEN, W. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3856–3864, 2002.

KOO, H. C.; PARK, Y. H.; HAMILTON M. J.; BARRINGTON, G. M.; DAVIES, C. J.; KIM, J. B.; DAHL, J. L.; WATERS, W. R.; DAVIS W. C. Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. **Infection and Immunity**, v.72, p.6870–6883, 2004.

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.

LAMBETH, C.; REDDACLIFF, L. A.; WINDSOR, P.; ABBOTT, K. A.; MCGREGOR, H.; WHITTINGTON, R. J. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.82, p. 504–508, 2004

LEE, H.; STABEL, J. R.; KEHRLI, M. E., JR. Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, p.73–85, 2001.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v. 25, p.402–408, 2001.

LILENBAUM, W.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W. M. R. Paratuberculosis: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 580-590, 2007.

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.

MALEK, T. R. The Biology of Interleukin-2. **Annual Review of Immunology**, V. 26, p.453–79, 2008.

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.

MOBIUS, P.; HOTZEL, H.; RASSBACH, A.; KÖHLER, H. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection

of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.126, n.4, p. 324–333, 2008.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W; GIEDLIN, M. A; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v.136, p. 2348–2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; SAD. S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2, and more. **Immunology Today Journal**, v.17, p.138–146, 1996.

MOTA, R. A.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; GOMES, M. J. P.; PEIXOTO, R. M.; MAIA, F. C. L.; BRITO, M. F.; CHIES, J. A. B.; SNEL, G. G. M.; BERCHT, B. S.; JUFFO, G. D.; Paratuberculose em um rebanho leiteiro no Estado de Pernambuco. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 74, n.2, p. 73-74, 2007.

MOTA, P. M. P. C.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A.; SALVARANI, F. M.; LEITE, R. M. H.; DIAS, L. D.; LEITE, R. C.; LOBATO, F. C. F.; GUEDES, R. M. C.; LAGE, A.P. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in the State of Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n. 9, p.703-706, 2009.

MULLINS, D. W.; MARTINS, R. S.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor cell-derived TGF-beta and IL-10 dysregulate paclitaxel-induced macrophage activation. **Journal Leukocyte Biology**, v. 69, p.129–137, 2001.

MUTWIRI, G. K.; BUTLER, D. G.; ROSENDAL, S.; YAGER, J. Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4074–4079, 1992.

NAGATA, R.; KAWAJI, S.; MINAKAWA, Y.; WANG, X.; YANAKA, T.; MORI, Y. A specific induction of interleukin-10 by the Map41 recombinant PPE antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 71–78, 2010.

NIELSEN, S. S. Danish control program me for bovine paratuberculosis. **British Cattle Veterinary Association**, v. 15, p. 161–168, 2007.

NIELSEN, S. S.; BJERRE, H.; TOFT, N. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4610–4615, 2008.

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.

NIELSEN, S. S.; TOFT, N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, p. 1–14, 2009.

OKURA, H.; TOFT, N.; NIELSEN, S. S. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 253-263, 2012.

OLIVEIRA, D. M.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G. J. N.; ASSIS, A. C. O.; DANTAS, A. F. M.; BANDARRA, P. M.; GARINO JR., F. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p. 67-72, 2010.

ORMAECHEA, J. I.; GISBERT, J. P.; MARÍN-JIMÉNEZ, I. Papel de *Mycobacterium avium paratuberculosis* em la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn. **Gastroenterología y Hepatología**, v.32, p. 353-363, 2009.

OTT, S. L.; WELLSB, S. J.; WAGNERA, B. A.; Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, p.179-192, 1999.

PARK, S. U.; KATHAPERUMAL, K.; MCDONOUGH, S.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; BANNANTINE, J. P.; CHANG, Y.F. Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge. **Vaccine**, v.26, p.4329-4337, 2008.

PAUSTIAN, M. L.; AMONSIN, A.; KAPUR, V.; BANNANTINNE, J. Characterization of a novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium paratuberculosis*: implications to diagnosis of Johne's disease. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, p.2675-2681, 2004.

REDDACLIFF, L. A.; MARSH, I. B.; FELL, S. A.; AUSTIN, S. L.; WHITTINGTON, R. J. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from muscle and peripheral lymph nodes using acid-pepsin digest prior to BACTEC culture. **Veterinary Microbiology**, v.145, p.122-128, 2010.

RISTOW P.; MARASSI, C. D.; RODRIGUES, A. B.; OELEMANN, W. M.; ROCHA, F.; SANTOS, A. S.; CARVALHO, E. C.; CARVALHO, C. B.; FERREIRA, R.; FONSECA, L.S.; LILENBAUM, W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. **The Veterinary Journal**, v.174, p. 432–434, 2007.

ROBINSON, M. W.; O'BRIEN, R.; MACKINTOSH, C. G.; CLARK, R. G.; GRIFFIN, J. F. Immunoregulatory cytokines are associated with protection from immunopathology following *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in red deer. **Infection and Immunity**, 2011, v.79, p. 2089–2097, 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 eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

ROACH, D. R.; BEAN, A. G.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M. P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v. 168, p.4620–4627, 2002.

SANTOS, J. A.; SILVA, N. L. Sobre a primeira observação da paratuberculose no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinaria**, n. 24, p. 5-11, 1956.

SCHWARZ, D. G. G. **Distribuição de Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis em órgãos de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectado**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

SHANKAR, G.; PESTANO, L. A.; BOSCH, M. L. Interferon-gamma added during bacillus Calmette-Guérin induced dendritic cell maturation stimulates potent Th1 immune responses. **Journal of Translational Medicine**, v.1, p. 7, 2003.

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, p.3724–3732, 2004.

SHIN, J. S.; YOO, H. S.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. Comparative antibody response of 5 recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35KDa antigen for Map. **Journal Veterinary Science**, v. 5, p.111-117, 2004.

SHIN, S. J.; WU, C. W.; STEINBERG, H.; TALAAT, A. M. Identification of novel virulence determinants in *Mycobacterium paratuberculosis* by screening a library of insertional mutants. **Infection and Immunity**, v. 7, p. 3825–3833, 2006.

SIGURDARDOTTIR, O. G.; VALHEIM, M.; PRESS, C. M. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.819–834, 2004.

SMEED, J. A.; WATKINS, C. A.; RHIND, S. M.; HOPKINS, J. Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. **Veterinary Research**, v. 3, p. 18–28, 2007.

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.

SOHAL, J. S.; SINGH S. V.; TYAGI, P.; SUBHODH, S.; SINGH, P.K.; SINGH, A.V.; NARAYANASAMY, K.; SHEORAN, N.; SANDHU, K. S. Immunology of mycobacterial infections: With special reference to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. **Immunobiology**, v. 213, p.585–598, 2008.

STABEL, J. R.; GOFF, J. P.; WHIPPLE, D. L.; ACKERMANN, M. R.; REINHARDT, T. A. Low calcium diet and 1,25-dihydroxyvitamin D3 infusion modulate immune responses during *Mycobacterium paratuberculosis* infection in beige mice. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 50, p.127–143, 1996.

STABEL, J. R. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 754–760, 2000a.

STABEL, J. R. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 465–473, 2000b.

STEWART, D .J.; VAUGHAN, J. A. STILES, P. L.; NOSKE, P. J.; TIZARD, M. L.; PROWSE, S. J.; MICHALSKI, W. P.; BUTLER, K. L.; JONES, S. L. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: clinical disease, faecal culture and immunological studies. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 13–24, 2006.

STROMMENGER, B.; STEVENSON, K.; GERLACH, G. F. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.196, p. 31–37, 2001.

SWEENEY, R. W. Transmission of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 12, p. 305–312, 1996.

SWEENEY, R. W.; JONES, D. E.; HABECKER, P.; SCOTT, P. Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p.842–847, 1998.

TANAKA, S.; SATO, M.; TANIGUCHI, T.; YOKOMIZO, Y. Histopathological and morphometrical comparison of granulomatous lesions in BALB/c and C3H/HeJ mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.110, p. 381-388, 1994.

TANAKA, S.; ITOHARA, S.; SATO, M.; TANIGUCHI, T.; YOKOMIZO, Y. Reduced formation of granulomatosa in $\gamma\delta$ T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 415–421, 2000.

TANAKA, S.; SATO M.; ONITSUKA, T.; KAMATA H., YOKOMIZO, Y. Inflammatory Cytokine Gene Expression in Different Types of Granulomatous Lesions during Asymptomatic Stages of Bovine Paratuberculosis. **Veterinary Pathology**, v.42 ,p.579–588, 2005.

VALHEIM, M.; SIGURÐARDÓTTIR, O. G.; STORSET, A. K.; AUNE, L. G.; PRESS, C. M. Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v.131, p. 221–232, 2004.

VEAZEY, R. S.; HOROHOV, D. W.; KRAHENBUHL, J. L.; TAYLOR, H. W. OLIVER, J. L.; SNIDER, T. G. Comparison of the Resistance of C57/BL6 and C3H/He Mice to Infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.47, p.79-87, 1995.

VERNA, A. E.; GARCIA-PARIENTE, C.; MUNÓZ, M.; MORENO, O.; GARCÍA-MARIN, J. F.; ROMANO, M. I.; PAOLICCHI, F.; PÉREZ, V. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Zoonoses Public Health**, v. 54 243-252, 2007.

USDA-APHIS, 2011. **Johne's disease on U.S.dairies 1991–2007**. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Johnes.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2011.

WATERS, W. R.; MILLER, J. M.; PALMER, M. V.; STABEL, J. R.; JONES, D. E.; KOISTINEN, K. A.; STEADHAM, E. M.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; BANNANTINE, J. P. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5130–5138, 2003.

WATERS, W. R.; STABEL, J. R.; SACCO, R. E.; HARP, J. Á.; PESCH, B. A. Antigen specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium paratuberculosis* infection of cattle. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1593-1598, 1999.

WEISS, D. J.; SOUZA, C. D.; EVANSON, O. A.; SANDERS, M.; RUTHERFORD, M. Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 48–55, 2008.

WHITTINGTON, R. J.; SERGEANT, E. S. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. **Australian Veterinary Journal**, v.79, p.267–278, 2001.

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

WU, C. W.; SCHMOLLER, S. K.; SHIN, S. J.; TALAAT, A. M. Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in vitro and in naturally infected cows. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p.7877–7886, 2007.

YAMASAKI, E. M.; TOKARNIA, C. H.; GALVÃO, A; GOMES, M. J. P.; CHIES J. A. B.; VEIT, T. D.; ARAGÃO, A. P.; BRITO, M. F. Aspectos clínico-patológicos e controle da paratuberculose em rebanho bovino leiteiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.921-932, 2010.