

THAIS CRISTINE DOS SANTOS SOARES

**Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória em vacas
leiteiras vacinadas com distintos históricos de mastite por
*Staphylococcus aureus***

SÃO PAULO

2022

THAIS CRISTINE DOS SANTOS SOARES

**Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória em vacas
leiteiras vacinadas com distintos históricos de mastite por
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4177
FMVZ

Soares, Thais Cristine dos Santos
Proliferação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de memória em vacas leiteiras vacinadas com distintos históricos de mastite por *Staphylococcus aureus* / Thais Cristine dos Santos Soares. – 2022.
59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza.

1. *Staphylococci*. 2. Infecção intramamária. 3. Glândula mamária. 4. Resposta imunológica. 5. Resposta de células T. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 04 de março de 2022
CEUAX N 2896200122

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Fernando Nogueira De Souza

Área: Ceua-fmvz

Equipe envolvida: Thais Cristine Dos Santos Soares - (pós-graduando);

Título do projeto: "Proliferação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de memória em vacas leiteiras vacinadas com distintos históricos de mastite".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 04/03/2022, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOARES, Thais Cristine dos Santos

Título: **Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória em vacas leiteiras vacinadas com distintos históricos de mastite por *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais amados (Elivelth e Jane), aos meus avós (Jayro e Maria), ao meu noivo Gabriel, aos meus animais de estimação (Bob, Charles, Kovu, Safira, Milady, Scott e Lupinha), e aos amados animais que eu espero ajudar com a minha pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Elivelth (*in memorian*) e Jane por me apoiarem nas minhas escolhas, por mais que nem sempre tenham concordado comigo. Agradeço a eles também por todas as oportunidades que me ofereceram, sendo que a maioria delas tenham lhes sido negadas; também por sempre terem me incentivado a estudar e por terem me ensinado que o conhecimento e cultura são coisas que nunca poderiam ser tiradas de mim, esse ensinamento sempre me fez estudar e querer ser melhor do que fui ontem.

Agradeço aos meus avós Jayro e Maria (*in memorian*), pois assim como meus pais, me incentivaram a ser minha melhor versão, assim como me incentivaram em relação ao meu amor pelos animais e ao meu sonho em cuidar deles desde criança.

Agradeço ao meu noivo Gabriel Lippmann, sem ele provavelmente eu não teria conseguido ir tão longe. Agradeço por todos seus cuidados, apoio e por estar ao meu lado durante tanta coisa que já passamos juntos.

Agradeço aos meus filhos de quatro patas, Bob, Charles, Scott, Kovu, Milady, Safira e Lupinha, por fazerem parte da minha vida e por estarem comigo em tantos momentos de nossas vidas, sem vocês meu mundo não teria cor, nem brilho e provavelmente eu não seria quem sou hoje.

Agradeço à Prof^a Dr^a Alice Maria Melville de Paiva Della Libera por ter me acolhido em sua equipe, por ter me aberto as portas da pós-graduação na USP e por ter me apresentado meu orientador, Prof^o Dr^o Fernando Nogueira de Souza. Agradeço também por ter estado ao meu lado no pior momento da minha vida, sou muito grata por isso. A senhora não é somente um exemplo de profissional, de mulher, mas também de ser humano, sou eternamente grata por todas as oportunidades que me deu.

Agradeço ao meu orientador, Prof^o Dr^o Fernando Nogueira de Souza, por ter me dado essa oportunidade maravilhosa de contribuir para a sociedade, por toda paciência que teve nessa jornada e por todos os ensinamentos que me passou. Agradeço por ter confiado em mim e acreditado na minha capacidade quando eu mesma duvidei dela. O considero um pesquisador e uma pessoa brilhante, tenho muito orgulho por ter sido sua orientada, espero que ainda possamos trabalhar juntos em muitos projetos, tornando o mundo melhor.

Agradeço também aos meus professores da graduação pois sem eles eu nunca teria conseguido meu imenso sonho de ser médica veterinária. Agradeço especialmente ao Profº Drº Ivan Roque de Barros Filho e ao Profº Drº José Francisco Ghignatti Warth por tudo que me ensinaram e por todas as oportunidades que me deram possibilitando me aprofundar nas áreas que são minhas paixões dentro da veterinária.

Agradeço à Universidade de São Paulo por possibilitar a realização de mais um sonho.

Agradeço às minhas colegas de equipe, Kamilla Reis Santos e Raysa Brenda Marques Maia por terem me ajudado na execução do projeto, foi uma época muito intensa, com várias noites mal dormidas, mas que só foi possível com a ajuda de vocês.

Agradeço à secretária da pós-graduação do PCVET, a Sra Adelaide por ter ajudado todas as vezes que eu precisei, inclusive quando não havia problema, mas eu achava que havia.

Agradeço à equipe da Biblioteca da FMVZ/USP por serem sempre solícitos a nos ajudar e que sem eles essa jornada seria ainda mais difícil.

Agradeço aos meus amigos por estarem ao meu lado sempre, por me ouvirem, pelo apoio quando eu me desesperei, por me incentivarem e por estarem ao meu lado, vocês são muito importantes para mim.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa de mestrado, processo número 88887.503617/2020-00.

*“O homem que sabe reconhecer os limites da sua própria inteligência está mais perto da
perfeição”*

Johann W. Von Goethe

RESUMO

SOARES, T. C. S. Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória em vacas leiteiras vacinadas com distintos históricos de mastite por *Staphylococcus aureus*. 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A mastite bovina é a doença de maior impacto negativo na pecuária leiteira devido à diminuição da produção e qualidade do leite e produtos lácteos. *Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes patógenos da mastite bovina devido à sua patogenicidade, contagiosidade e refratariedade ao tratamento antimicrobiano, além de questões críticas relacionadas à segurança alimentar e saúde pública. Há cada vez mais evidências de que a defesa contra *S. aureus* depende dos linfócitos T. Diante deste cenário, a comparação da resposta de linfócitos T em animais sadios que foram expostos ao patógeno e permaneceram sadios com animais que não permaneceram sadios (infectados por *S. aureus*) pode nos ajudar a identificar respostas imunes associadas a resistência à infecção, ou seja respostas imunes que conferem proteção contra este patógeno, aqui avaliada pela capacidade de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ sanguíneos, e sua população de memória, estimulados ou não com *S. aureus*. Ademais, o presente estudo nos permitiu avaliar estas respostas imunes em dois momentos em animais vacinados ou não com vacina comercial. Para a realização deste estudo, amostras de sangue periférico de 25 animais foram coletadas antes do início do protocolo vacinal (D0) e após 21 dias da última dose vacinal (D118). As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll, e em seguida, foi realizada a proliferação de linfócitos na ausência (basal) e presença de isolado de *S. aureus* inativado pelo calor proveniente de caso mastite bovina persistente. A proliferação de linfócitos foi determinada pela expressão de Ki67 por citometria de fluxo. Para a identificação das populações de linfócitos, a imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo com os seguintes anticorpos monoclonais: CD4, CD8, CD45R0, CD44 e CD62L. No presente estudo identificamos que vacas infectadas por *S. aureus* apresentaram menor proliferação de linfócitos, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos de memória geral quando

estimulados com isolado de *S. aureus*. Ademais, nenhum efeito da vacinação na proliferação das populações de linfócitos sanguíneos foi observado. No entanto, observamos que a proliferação de linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ de memória indiferenciável e linfócitos T CD8⁺ de memória efetora foi maior no primeiro momento que no segundo momento. Desta forma, concluímos que a regulação negativa da resposta de células T frente à estimulação por *S. aureus* é crucial para a persistência das infecções intramamárias por *S. aureus*, e que a ausência da resposta vacinal na proliferação de linfócitos T pode justificar a insatisfatória resposta à vacinação encontrada a campo.

Palavras-chave: *Staphylococci*. infecção intramamária. glândula mamária. resposta imunológica. resposta de células T.

ABSTRACT

SOARES, T. C. S. T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes proliferation, and their memory subpopulations, in dairy cows with distinct history of *Staphylococcus aureus* mastitis. 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Bovine mastitis is the disease that has the greatest negative impact on dairy farming, since it results in a drop in milk production and quality. *Staphylococcus aureus* is a significant pathogen of bovine mastitis due to its pathogenicity, contagiousness, and refractoriness to antimicrobial treatment, as well as critical issues related to food safety and public health. There is growing evidence that the protective immune defense against *S. aureus* depends on T cells. In this scenario, comparing the T lymphocyte response in healthy animals exposed to the pathogen and remaining healthy versus animals that did not remain healthy (infected with *S. aureus*) can aid in identifying immune responses associated with resistance to infection, that is, immune responses that provide protection against this pathogen, as measured here by the proliferation capacity of CD4⁺ and CD8⁺ blood T lymphocytes, as well as their memory population, under stimulation with *S. aureus*, as without any stimulation (control). Additionally, the current investigation enabled us to analyze these immune responses in animals that had been vaccinated or had not been immunized with a commercial vaccine at two points in time. To conduct this investigation, peripheral blood samples were taken from 25 animals before and 21 days following the initiation of the immunization procedure (D0) (D118). Ficoll density gradient separation was used to isolate peripheral blood mononuclear cells, and subsequently lymphocyte proliferation was performed in the absence (baseline) and presence of a heat-inactivated *S. aureus* isolate from chronic bovine mastitis. Lymphocyte proliferation was measured by flow cytometry and immunophenotyping with the following monoclonal antibodies: CD4, CD8, CD45R0, CD44, and CD62L was used to identify lymphocyte populations. In the present study we found *S. aureus*-infected cows had an inhibition on lymphocyte, T CD4⁺ lymphocyte, and memory lymphocyte proliferation when stimulated with *S. aureus*. Furthermore, immunization had no influence on the expansion of blood lymphocyte populations. However, we noticed that the first moment resulted in higher proliferation of T CD8⁺ cells, memory T CD8⁺ lymphocytes, and effector memory T CD8⁺

lymphocytes than the second moment. Thus, we conclude that negative regulation of the T cell response is required for the persistence of *S. aureus* intramammary infections and that the absence of the vaccine response in T lymphocyte proliferation may account for the field's unsatisfactory response to vaccination.

Keywords: *Staphylococci*. intramammary infection. mammary gland. immune response. T cell response.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenciação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ naïve que podem se diferenciar em Th1, Th2, Th3 e Treg e suas respectivas citocinas que podem ser produzidas por cada uma dessas subpopulações (adaptação de MANIATI; SOPER; HAGEMANN, 2010). IL-4: interleucina-4; IL-5: interleucina-5; IL-10: interleucina-10; IL-12: interleucina-12; IL-13: interleucina-13; IL-17A: interleucina-17A; IL-17F: interleucina-17F; IL-21: interleucina-21; TGF- β : fator de transformação de crescimento- β23

Figura 2 – Grupos experimentais. IPV = infectado antes da vacinação, HPV = saudável antes da vacinação, INVI = infectado, não vacinado e continuou infectado, IVNC = infectado, vacinado e não foi curado, IVC = infectado, vacinado e curado, HVH = saudável, vacinado e continuou saudável.....32

Figura 3. Linha do tempo do protocolo vacinal, das coletas de amostras de leite para exame bacteriológico e contagem de células somáticas, e coleta de amostras de sangue periférico para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). d-14: 14 dias antes da aplicação da primeira dose da vacina; d-7: 7 dias antes da aplicação da primeira dose da vacina; d0: dia da aplicação da primeira dose da vacina; d35: dia da aplicação da segunda dose da vacina; d97: dia da aplicação da terceira dose da vacina; d104: 7 dias após a última dose da vacina ; d111: 14 dias após a última dose da vacina d118: 21 dias após a última dose da vacina.....33

Figura 4. Vacas leiteiras com infecção intramamária por *S. aureus* apresentam menor capacidade proliferativa de linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺, e linfócitos de memória (CD45RO⁺) quando estimulados com *S. aureus*.....40

Figura 5. Proliferação dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ de memória (CD45RO⁺) e linfócitos T CD8⁺ de memória efetora (CD45RO⁺ CD44^{high} CD62L^{low}) quando estimulados com *S. aureus* no momento 0 (d0; logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina) e momento 1 (d118; 118 dias após à aplicação da primeira dose da vacina, e 21 dias após a terceira dose)41

Figura 6. Vacas leiteiras com infecção intramamária por *S. aureus* apresentam menor capacidade proliferativa de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ de memória (CD45RO⁺) quando estimulados com *S. aureus* no momento 0 (d0; logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina)42

Figura 7. Proliferação de linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos de memória efetora (CD45RO⁺ CD44^{high} CD62L^{low}) em animais sadios e com infecção intramamária por *S. aureus* no momento 0 (d0; logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina)42

LISTA DE TABELAS

Tabela suplementar 1: Anticorpos monoclonais (mAbs) usados para determinação da proliferação das distintas populações de linfócitos T.....	59
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 MASTITE	18
2.2 MASTITE POR STAPHYLOCOCCOS AUREUS.....	20
2.3 RESPOSTA DE LINFÓCITOS T NA INFECÇÃO POR <i>S. AUREUS</i>	22
2.4 VACINA CONTRA A MASTITE BOVINA	26
3. CAPITULO 1 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E T CD8⁺ DE MEMÓRIA EM VACAS LEITEIRAS VACINADAS COM DISTINTOS HISTÓRICOS DE MASTITE POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.....	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	29
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.2.1 Rebanho.....	31
3.2.2 Animais, amostras e vacinação.....	32
3.2.3 Definição de infecção intramamária.....	34
3.2.4 Coleta de amostras de sangue.....	34
3.2.5 Coleta de amostras de leite.....	34
3.2.6 Contagem de células somáticas.....	35
3.2.7 Análise bacteriológica.....	35
3.2.8 Preparação do inóculo bacteriano.....	35
3.2.9 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico.....	36
3.2.10 Cultura de CMSP.....	37
3.2.11 Proliferação de distintas subpopulações de linfócitos.....	37
3.2.12 Análise estatística.....	39
3.3 RESULTADOS.....	39
3.4 DISCUSSÃO.....	43
3.5 CONCLUSÃO.....	45
3.6 REFERÊNCIAS.....	46
4. CONSIDERAÇÕES.....	51
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS – INTRODUÇÃO & REVISÃO	52
6. APÊNDICE.....	58

1. INTRODUÇÃO

Mastite bovina é a doença mais prevalente e de maior impacto na pecuária leiteira mundial (RUEGG, 2017; RAINARD *et.al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2020). Essa doença pode ser causada por vários microrganismos, mas apenas algumas espécies são prevalentes e constituem um desafio para a saúde da glândula mamária. Entre os agentes etiológicos da mastite bovina, destaca-se *Staphylococcus aureus* devido ao seu perfil contagioso, persistência da infecção, patogenicidade, e baixas taxas de curas associadas às terapias atuais, além de estar associado com as maiores perdas econômicas entre todos os patógenos de mastite (HASALA *et.al.*, 2009; RAINARD *et al.*, 2018; CUNHA, 2020).

Staphylococcus aureus ainda apresenta grande capacidade de migração entre espécies refletindo na saúde única e na segurança alimentar (MOURA *et al.*, 2018; RICHARDSON *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2020); sendo os bovinos considerados como o principal reservatório animal para o surgimento de clones epidêmicos humanos de *S. aureus* (RICHARDSON *et al.*, 2018). Por outro lado, há estudos que sugerem que a cepa de *S. aureus* causadora de mastite teve origem de bactérias que causavam doenças em humanos, e por consequência, apresentam potencial de trocar informações determinantes para resistência à antimicrobianos (RAINARD *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus é uma bactéria extracelular facultativa com vários mecanismos de escape do sistema imunológico (FOSTER, 2005; VAN KESSEL *et.al.*, 2014, RAINARD *et. al.*, 2018). É notório que a defesa contra *S. aureus* depende da resposta imune inata, especialmente dos neutrófilos pelo processo de fagocitose e por sua capacidade microbicida, que agem em conjunto com o sistema imune adaptativo (RAINARD *et. al.*, 2020). O processo de fagocitose é facilitado e intensificado pela ligação de anticorpos específicos, no entanto, os linfócitos T apresentam papel crucial, pois: 1) os linfócitos T são importantes para a produção de anticorpos opsonizantes, pois são necessárias para a maturação da afinidade do anticorpo e troca de classe; 2) os linfócitos T promovem a fagocitose pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção; 3) *Staphylococcus aureus* não é exclusivamente uma bactéria extracelular e, conseqüentemente, a

eliminação intracelular de *S. aureus* é dependente dos linfócitos T; e 4) os linfócitos T são fundamentais para (re)estabelecer a homeostase imunológica (BRÖKER; MROCHEN; PETON, 2016). Neste contexto, há uma crescente evidência da importância dos linfócitos T na defesa contra as infecções por *S. aureus*, e, portanto, merece ser melhor investigada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE

A mastite ocorre quando o agente infeccioso entra pelo canal do teto. Logo após a entrada da bactéria invasora, a imunidade inata reconhece o patógeno invasor por meio de receptores padrão de reconhecimento e inicia a resposta inflamatória necessária para eliminar a bactéria invasora. Essa resposta inflamatória inicial libera citocinas e quimiocinas para o rápido e maciço influxo de neutrófilos sanguíneos para o local da infecção, que formam a primeira linha de defesa celular contra bactérias (SOUZA *et al.*, 2012).

Portanto, a mastite é definida como o processo inflamatório da glândula mamária que pode ser causada por diversos agentes etiológicos como algas, fungo, vírus e principalmente bactérias. Ela é a doença mais frequente em rebanhos leiteiros em todo o mundo, causando grandes impactos negativos na pecuária leiteira (RUEGG, 2017). Dentre as causas mais comuns dessa doença encontram-se as bactérias que podem ser divididas em contagiosas ou ambientais, sendo que classificamos as bactérias como contagiosas quando são provenientes de microrganismos originários de outros animais ou quartos mamários (ex. *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*), sendo geralmente adaptados às condições do ambiente mamário, enquanto que as ambientais são encontradas no local em que os animais vivem (ex. *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, e *Streptococcus uberis*) (VITALI *et al.*, 2020). As bactérias com perfil predominantemente contagioso mais frequentemente isoladas de amostras de leite assepticamente coletadas são *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus não-aureus* (BIERGEL JUNIOR, 2021), sendo que *S. aureus* é considerada a mais importante.

É possível classificar as mastites de acordo com sua manifestação em clínica (quando é possível a visualização de alterações macroscópicas no leite e/ou no úbere do animal) e subclínica (quando só é possível perceber alterações no leite de forma indireta, como pela análise da composição do leite ou pela contagem de células somáticas) (FORSBÄCK, 2010; PUMIPUNTU, 2017; DE VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018).

No caso da mastite clínica, o leite proveniente do quarto afetado pode ser mais viscoso ou diluído com alteração da cor podendo ser encontrado grumos, flocos, coágulos, pus ou sangue (PINHEIRO, 2016). Podemos encontrar edema, eritema e endurecimento dos quartos mamários e do úbere, além de sinais sistêmicos como anorexia, desidratação, fraqueza, febre e nos casos mais graves o animal pode vir à óbito devido a uma sepse (ROYSTER; WAGNER, 2015). Ainda é possível classificar a mastite clínica quanto a sua gravidade em leve, moderado ou grave (WENZ; GARRY; BARRINGTON, 2006). Nos casos leves encontramos apenas alteração no leite, representando cerca de 60 a 90% de todos os casos de mastite clínica (WENZ; GARRY; BARRINGTON, 2006; ROBERSON, 2010). Nos casos de mastite clínica moderada encontramos alterações no leite e no úbere, e nos casos graves de mastite clínica já podemos observar sinais sistêmicos no animal (LAGO *et.al.*, 2010).

Na mastite subclínica não encontramos alterações macroscópicas no leite nem alterações físicas no animal afetado, ou seja, sem manifestações clínicas aparentes (PINHEIRO, 2016). Justamente por ser uma doença de difícil percepção, ela causa grandes prejuízos na cadeia leiteira, pois pode demorar até ser diagnosticada. Ela é responsável por significativa queda na produção de leite, aumento da taxa de descarte precoce de animais, pode evoluir para mastite clínica (REKSEN *et. al.*, 2006; REKSEN; SØLVERØD; ØSTERÅS, 2007), além das vacas infectadas serem fonte de infecção para vacas sadias (ZADOCKS *et. al.*, 2001). A principal forma de detecção desse problema é a partir da análise da contagem de células somáticas do leite (CCS), considerado um bom marcador de qualidade do leite. A CCS é composta basicamente por células do sistema imunológico tanto nos animais sadios, quanto nos animais que apresentam mastite (SORDILLO *et. al.*, 1997), sendo essas células divididas em linfócitos, macrófagos, leucócitos

polimorfonucleares e células epiteliais (PILLAI *et al.* 2001). No entanto, a população predominante no leite de animais sadios e infectados são os macrófagos e neutrófilos, respectivamente (BLAGITZ *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2020).

2.2 MASTITE POR STAPHYLOCOCCOS AUREUS

A mastite causada por *S. aureus* é de extrema importância para a pecuária leiteira devido principalmente à sua alta prevalência nos rebanhos e aos prejuízos causados por ela, sendo estes diretamente relacionados a queda da produção do leite e de sua qualidade (FETROW *et al.*, 1991). As perdas são altas em todos os segmentos da cadeia produtiva sendo que na indústria encontramos menor rendimento na produção de produtos lácteos, diminuição do tempo de prateleira e queda da qualidade desses produtos (FETROW *et al.*, 1991). Para o produtor as perdas também são grandes devido redução na produção e na qualidade do leite, gastos com medicamentos para tratar os animais afetados, pois geralmente são necessários longos períodos de tratamento; levando até mesmo ao descarte precoce de animais (COSTA, 1998; LOPES *et al.*, 2011, 2012; RAINARD *et al.*, 2018).

O processo infeccioso inicia com a entrada da bactéria pelo canal do teto (SOUZA *et al.*, 2012), seguido pelo estabelecimento do processo inflamatório e ativação do sistema imunológico que leva à migração de leucócitos para eliminação do agente, que em conjunto com as células de descamação do epitélio mamário são chamadas de células somáticas (CARNEIRO *et al.*, 2009). A elevação da contagem de células somáticas (CCS) no leite acontece na presença de microrganismos patogênicos presentes na glândula mamária, segundo estudos, nos casos de mastite por *S. aureus* esse aumento de CCS inicia nas primeiras três horas da entrada da bactéria e pode chegar a 10^6 células por mililitro (mL) nas primeiras 24 horas (SUTRA; POUTREL, 1994).

De acordo com diversos trabalhos encontrados na literatura, o tratamento para mastite causada por *S. aureus* não apresenta boa eficiência. A decisão sobre o tratamento desses animais deve considerar alguns fatores como: 1) idade da vaca; 2) estágio da lactação; 3) número de quartos infectados; 4) posição dos quartos infectados; 4) taxa de eliminação de bactérias no leite; e 5) gravidade do processo

inflamatório (OWENS *et. al.*, 1988; SOL *et. al.*, 1997; DINGWELL *et. al.*, 2003). As taxas de cura contra infecções por *S. aureus* são consideradas baixas, com tendência à cronicidade, e pode ser influenciada por fatores, como fatores de virulência presente nas distintas cepas dessa bactéria, influenciando também a resposta dessas bactérias frente à antimicrobianoterapia (BARKEMA *et al.*, 2006).

Staphylococcus aureus é uma bactéria com grande potencial de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, o que dificulta a escolha da terapia de escolha e justificando as baixas taxas de sucesso com seu uso. Segundo estudos em humanos, em torno de 50% das infecções causadas por *S. aureus* são resistentes à meticilina, uma das últimas opções de terapêutica disponíveis, e pelo menos 95% das infecções encontradas por esse agente apresentam resistência à penicilina ou ampicilina (FATTOM *et.al.*, 2004). Em bovinos, há relatos de que a prevalência de isolados de *S. aureus* apresentando resistência à penicilina é maior em vacas mais velhas (BARKEMA *et al.*, 2006).

Além disto, o uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto na medicina veterinária quanto na humana, contribuem imensamente para ampla ocorrência de resistência associada a esta bactéria, agravando ainda mais o sucesso do tratamento de doenças infecciosas causadas por este patógeno (RAINARD *et al.*, 2018).

Além dos impactos econômicos e preocupação relacionados à mastite por *S. aureus*, encontramos o risco à segurança alimentar causada pelo consumo de produtos lácteos contaminados pela bactéria ou pela presença de toxinas produzidas por elas que podem gerar graves intoxicações alimentares podendo ser letais (CERQUEIRA; LEITE, 1995; VERAS *et al*, 2008; MOURA *et al.*, 2018; RICHARDSON *et al.*, 2018). Isso acontece, pois, as toxinas são resistentes às ações das enzimas digestórias (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003), assim como à altas temperaturas, mantendo-se estáveis a 100°C por até 30 minutos (MURRAY *et.al.*, 2000), permanecendo ativas à pasteurização e demais processos térmicos (JAY, 2005).

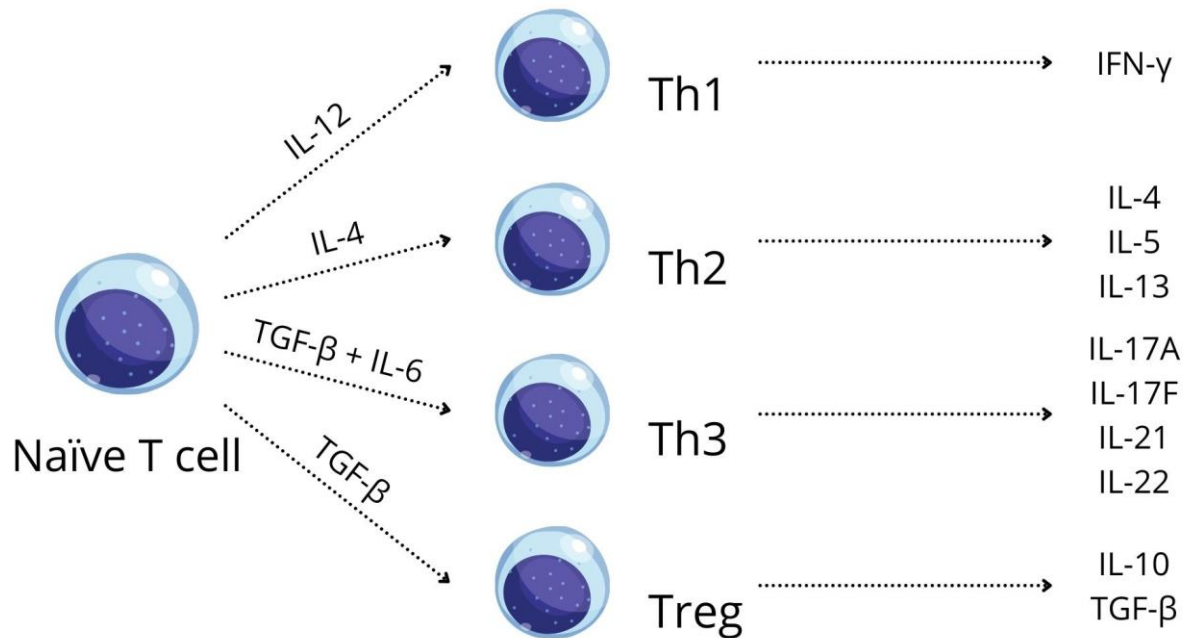
2.3 RESPOSTA DE LINFÓCITOS T NA INFECÇÃO POR *S. AUREUS*

A infecção intramamária inicia com a entrada de *S. aureus* pelo canal do teto, sendo necessário baixas concentrações de bactérias para induzir a resposta inflamatória (NEWBOULD; NEAVE, 1965; RAINARD *et al.*, 2018). Isso nos indica que essa bactéria é extremamente adaptada ao tecido glandular mamário (RAINARD *et al.*, 2018). Após a entrada, há uma disseminação por todo o sistema glandular e a proliferação bacteriana no leite (RAINARD *et al.*, 2018), que logo são detectados pelo epitélio mamário e leucócitos residentes levando à ativação de uma reação inflamatória com influxo de neutrófilos para o local da infecção (LE GALL; PLOMMET, 1965; RAINARD *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus possui a capacidade de entrar nas células e sobreviver ali, esse mecanismo pode ser uma das razões pelas quais a bactéria resiste ao tratamento com antimicrobianos, assim como pode justificar insatisfatória proteção conferida pela imune resposta humoral (JANSEN *et al.*, 2013; FOSTER *et al.*, 2014). Embora a resposta imune humoral é importante na prevenção da infecção por *S. aureus*, a importância da resposta celular é indispensável para proteção contra patógenos intracelulares (SEDER; HILL, 2000), não obstante, a expressão de interferon (IFN)- γ é reduzida em vacas cronicamente infectadas por *S. aureus* (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2001).

Os linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) e T CD8⁺ (citotóxico) são responsáveis pela mediação da resposta imunológica celular, sendo que os linfócitos T CD4⁺ reconhecem os antígenos através das células apresentadoras de antígenos (APC) como, por exemplo, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II. A próxima etapa do processo de resposta celular seria a diferenciação das células T CD4⁺ naïve que podem diferenciar em: 1) Th1, produtor de IFN- γ ; 2) Th2 que produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13; 3) Th3 responsáveis pela produção das citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22; ou 4) T reg que produz o fator de transformação de crescimento (TGF)- β e IL-10, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Diferenciação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ naïve que podem se diferenciar em Th1, Th2, Th3 e Treg e suas respectivas citocinas que podem ser produzidas por cada uma dessas subpopulações (adaptação de Maniati; Soper; Hagemann, 2010). IL-4: interleucina-4; IL-5: interleucina-5; IL-10: interleucina-10; IL-12: interleucina-12; IL-13: interleucina-13; IL-17A: interleucina-17A; IL-17F: interleucina-17F; IL-21: interleucina-21; TGF- β : fator de transformação de crescimento- β



Fonte: Soares (2022), adaptado de MANIATI, *et al.*(2010)

Enquanto os linfócitos T CD4⁺ reconhece os antígenos a partir do MHC de classe II, os linfócitos T CD8⁺ os reconhecem a partir do MHC de classe I, exercem a função de produzir citocinas, como IFN- γ e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que são responsáveis por mediar a morte de organismos intracelulares, e pelo mecanismo citolítico mediado por porfirinas e granzimas. Através de todos esses mecanismos supracitados, os linfócitos T CD8⁺ são capazes de eliminar as células infectadas a partir de processos apoptóticos mediados por Fas ligante (SEDER, 2000).

Entretanto, sabemos a importância do IFN- γ na morte de agentes intracelulares em diversas infecções, assim como sua capacidade de aumentar as atividades microbicidas e fagocitárias dos fagócitos contra *S. aureus* (SORDILLO *et al.*, 1991). Por outro lado, *S. aureus* também apresenta a capacidade de resistir à

fagocitose, sendo um mecanismo importante de escape do sistema imunológico e de patogenicidade (FOSTER, 2005; VAN KESSEL *et.al.*,2014, RAINARD *et al.*, 2018). Nos casos de mastite o aumento significativo de células T acontece não por acaso, mas por causa devido suas funções cruciais no local da infecção. Além disto, os linfócitos T $\gamma\delta$ possuem importante atividade citotóxica nos bovinos e sua redução está associada com aumento da susceptibilidade à infecção (DENIS *et.al.*, 2009). Assim há crescente evidência da importância da população de linfócitos T $\gamma\delta$ de memória na proteção contra reinfecções por *S. aureus*, demonstrada em modelo murino, devido a sua expressiva produção de IL-17 (MURPHY *et.al.*,2014).

Staphylococcus aureus é responsável pela produção de diversas toxinas, sendo uma delas a α -toxina (TEYMOURNEJAD; MONTGOMERY, 2021), que tem sido usada em alguns estudos no desenvolvimento de vacinas. Em estudos em que houve indução de mastite em animais vacinados com a α -toxina, foi possível observar que linfócitos T CD8⁺ foram recrutados mais precocemente que os linfócitos T CD4⁺ (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2000). Essa toxina pode induzir a produção expressiva de IL-17, levando a ativação e recrutamento de neutrófilos (DOSOGNE; VANGROENWEGHE; BURVENICH, 2002). Em estudos a campo, foi possível observar aumento na proporção da relação linfócitos T CD4⁺/T CD8⁺ durante a infecção intramamária crônica por *S. aureus* (SOLTYS; QUINN,1999), sugerindo que a proliferação e migração dessas populações linfocitárias são determinantes durante os estágios iniciais da infecção. As células de memória são importantes nos animais vacinados com a α -toxina, pois pode tornar a resposta inflamatória na glândula mamária desses animais mais precoce e eficiente por já estarem presentes no local da infecção (MEHRZAD; DUCHATEAU; BURVENICH, 2005), podendo favorecer a migração rápida dos leucócitos polimorfonucleares (PMNL) (MEHRZAD; DUCHATEAU; BURVENICH, 2005; NIEBUHR *et.al.*, 2011).

Estudos recentes mostraram a necessidade da interleucina 17 (IL-17) para que haja ação protetiva contra infecções por *S. aureus* (IWAKURA *et.al.*, 2008; CUA; TATO, 2009; MINEGISHI; KARASUYAMA, 2009; SPELLBER; DAUM, 2010; PROCTOR, 2012; MURPHY *et.al.*, 2014). Os linfócitos Th3 são responsáveis pela produção de IL-17 que é essencial para ativação e recrutamento de linfócitos e PMNL

(SPELLBER; DAUM, 2010; BOUGARN *et.al.*, 2011; PROCTOR, 2012; JANSEN *et.al.*, 2013; MURPHY *et.al.*, 2014), mediando a comunicação entre as células epiteliais e o sistema imunológico (FISCHER, 2008). Receptores para IL-17 e IL-22 podem ser expressos em células epiteliais, e a exposição a IL-17 induz liberação de quimiocinas e de fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) o que resulta na ativação e recrutamento de neutrófilos eliminando as bactérias (KEHRLI *et.al.*, 1991; IWAKURA *et.al.*, 2008; SPELLBER; DAUM, 2010; BOUGARN *et.al.*, 2011).

Ademais, alguns trabalhos usaram murinos como modelo e assim foi possível demonstrar que animais que apresentavam defeitos em linfócitos Th3, ou nas células que dependem das citocinas produzidas por essas células, apresentaram maior susceptibilidade as infecções por *S. aureus* (KOLLS; LINDEN, 2004; MINEGISHI; KARASUYAMA, 2009; PUEL *et.al.*, 2011). Não por acaso, a modulação da resposta inflamatória antígeno-específica e a rápida mobilização de neutrófilos para o sítio da infecção tem sido relacionado a linfócitos T CD4⁺ que produzem as citocinas IL-17A, IL17F e IFN- γ (WEAVER *et al.* 2006; RAINARD *et al.*, 2013; MURPHY *et al.*, 2014).

O principal processo que determina o sucesso na eliminação desse patógeno é o rápido influxo de PMNL que apresenta alta capacidade microbicida para o local da infecção (PAAPE *et.al.*, 2003), e ao estarem na glândula mamária, essa população age como fagócitos impedindo a persistência e/ou o estabelecimento da infecção. Portanto, o principal mecanismo de eliminação dos patógenos envolvidos na etiologia das mastites é através das espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidos pelos PMNL durante a fagocitose do patógeno, e entre elas estão ácidos hipocloroso, peróxido de hidrogênio, e superóxidos que são liberados dentro de vacúolos que contém os patógenos em seu interior (WORKU *et. al.*, 1994; PAAPE *et.al.*, 2003). O reconhecimento de antígenos por anticorpos específicos é essencial para que os PMNL desempenhem sua função fagocítica, e IgM e IgG2 são os principais anticorpos de opsonização na glândula mamária dos bovinos (WORKU; PAAPE; MARQUARDT, 1994). Na literatura há relato de aumento da função fagocítica de PMNL, quando incubados com IFN- γ recombinante que resultou em alta ligação de IgG2 por PMNL (WORKU *et.al.*, 1994; PAAPE *et.al.*, 2003). Diante do

supracitado, fica clara a importância de linfócitos Th1 (responsáveis pela produção de IFN- γ), e especialmente Th3 (que desempenha papel importante na resposta mediada por neutrófilos) na defesa da glândula mamária bovina.

2.4 VACINA CONTRA A MASTITE BOVINA

Para o desenvolvimento de uma vacina eficiente, ela deve ser capaz de conferir proteção contra novas infecções, sendo necessária estimulação da resposta imunológica celular e humoral (SEDER; HILL, 2000; SHKRETA *et al.*, 2004; TALBOT; LACASSE, 2005; DENIS *et al.*, 2009; FUAREZ *et al.*, 2010; PELLEGRINO *et al.*, 2010). *Staphylococcus aureus*, por sua capacidade de internalização celular, necessita prioritariamente da resposta celular para sua eliminação. Portanto, apesar do sucesso da maioria das vacinas existentes depender da imunidade humoral para conferir proteção contra novas infecções, esta resposta não é suficiente para conferir proteção nas infecções por muitos patógenos intracelulares.

No entanto, tendo em vista todos os problemas associados à infecção por *S. aureus*, a produção de uma vacina eficiente tanto na prevenção à novas infecções quanto à cura de infecções pré-existentes, seria a abordagem mais eficiente no controle dessa doença. Até o momento, apesar da existência de algumas vacinas comerciais contra *S. aureus* no mercado, nenhuma é capaz de conferir proteção contra novas infecções (TALBOT; LACASSE, 2005; DENIS *et al.*, 2009; MIDDLETON; LUBY; ADAMS, 2009; RAINARD *et al.*, 2020), sendo um desafio no controle de infecções intramamárias.

Apesar de algumas vacinas comerciais disponíveis no mercado para o controle da mastite, há poucos estudos comprovando sua eficácia. No presente estudo usamos a vacina polivalente Startvac (Hipra, Porto Alegre, Brasil), que é empregada em vários países, destacando que é a única vacina para mastite bovina cujo uso é aprovado na União Europeia. Schukken *et al.* (2014) encontraram resultados moderados de eficácia, sendo que animais em primeira lactação apresentaram melhores resultados que animais com mais lactações. Landin *et al.* (2015) não encontraram efeitos benéficos na saúde do úbere ou na produção de leite com seu uso. Por outro lado, PIEPERS *et al.* (2017) observaram menor resposta

inflamatória nos animais vacinados ao serem desafiados pela inoculação de *S. aureus* heterólogo morto e conseqüentemente uma menor queda da produção de leite, associados a uma resposta Th1, porém uma resposta Th3 não foi demonstrada.

CAPÍTULO 1 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E T CD8⁺ DE MEMÓRIA EM VACAS LEITEIRAS VACINADAS COM DISTINTOS HISTÓRICOS DE MASTITE POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

RESUMO

A mastite é a doença de maior impacto na pecuária leiteira, e dentre os agentes etiológicos da mastite bovina destaca-se *Staphylococcus aureus* geralmente associado a infecções intramamárias persistentes e refratárias aos tratamentos antimicrobianos. Diante deste cenário, a comparação da resposta de linfócitos T em animais sadios que foram expostos ao patógeno e permaneceram sadios com animais que não permaneceram sadios (infectados por *S. aureus*) pode nos ajudar a identificar respostas imunes associadas a resistência à infecção, ou seja, respostas imunes que conferem proteção contra este patógeno, aqui avaliada pela capacidade de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ sanguíneos, e sua população de memória, estimulados ou não com *S. aureus*. Ademais, o presente estudo nos permitiu avaliar estas respostas imunes em dois momentos em animais vacinados ou não com vacina comercial. No presente estudo identificamos que vacas infectadas por *S. aureus* apresentaram menor proliferação de linfócitos, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos de memória quando estimulados com isolado de *S. aureus*. Ademais, nenhum efeito da vacinação na proliferação das populações de linfócitos sanguíneos foi observado. No entanto, observamos que a proliferação de linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ de memória e linfócitos T CD8⁺ de memória efetora foi maior no primeiro momento que no segundo momento. Desta forma, concluímos que a regulação negativa da resposta de células T é crucial para a persistência das infecções intramamárias por *S. aureus*, e que a ausência da resposta vacinal na proliferação de linfócitos T pode justificar a insatisfatória resposta à vacinação encontrada a campo.

Palavras-chave: estafilococos, infecções intramamárias, glândula mamária, resposta imune, células T.

ABSTRACT

Mastitis is the disease that has the largest impact on dairy farming, and among the etiological agents of bovine mastitis, *Staphylococcus aureus* stands out, frequently associated with persistent intramammary infections that are refractory to antimicrobial therapies. Given this scenario, comparing the T lymphocyte response in healthy animals that were exposed to the pathogen and remained healthy versus animals that were not healthy (infected with *S. aureus*) can aid in identifying immune responses associated with resistance to infection, that is, immune responses that provide protection against this pathogen, as measured here by the proliferation capacity of blood T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, as well as their memory population, stimulated by this pathogen. Furthermore, the current investigation allowed us to assess these immune responses in animals that had been vaccinated or had not been immunized with a commercial vaccine at two different times. When stimulated with *S. aureus* isolate, *S. aureus*-infected cows showed lower lymphocyte proliferation, T CD4⁺ lymphocyte proliferation, and memory lymphocyte proliferation. Furthermore, immunization had no influence on the expansion of blood lymphocyte populations. However, we found that T CD8⁺ cells, memory T CD8⁺ lymphocytes, and effector memory T CD8⁺ lymphocytes proliferated more in the first moment than in the second. As a result, we assume that negative regulation of the T cell response is critical for the persistence of *S. aureus* intramammary infections, and that the lack of a vaccine response in T lymphocyte proliferation could explain the field's poor vaccination response.

Key words: *Staphylococci*, intramammary infection, mammary gland, immune response, T cell response.

3.1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é definida como a inflamação da glândula mamária geralmente causada por infecção intramamária por bactérias. É ainda a doença mais

prevalente e com o maior impacto econômico global na pecuária leiteira (HOGEVEEN; VAN DER VOORT, 2017). Esta doença causa reduções acentuadas na produção de leite, diminuição da qualidade do leite e dos produtos lácteos. Além disso, a mastite tem grandes implicações para o bem-estar animal, meio ambiente, saúde pública e a imagem do setor lácteo e perante a sociedade (HOSPIDO; SONESSON, 2005; DE VLIEGHER *et al.*, 2012).

Entre vários patógenos causadores de mastite, apenas poucas espécies são prevalentes e constituem um problema real. *Staphylococcus aureus* é uma dessas bactérias que continua sendo um grande desafio para a indústria leiteira em todo o mundo devido a sua patogenicidade, perfil contagioso, persistência da infecção e as baixas taxas de cura associadas às terapias atuais (RAINARD *et al.*, 2018). Além disso, *S. aureus* é um dos principais patógenos mais frequentemente isolados dos casos de mastite em todo o mundo (BARKEMA *et al.*, 2006; TENHAGEN *et al.*, 2006; FERGUSON *et al.*, 2007; ØSTERÅS *et al.*, 2007; DUFOUR *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2016; TAPONNEN *et al.*, 2017), e está associado com as maiores perdas econômicas entre todos os patógenos de mastite (HALASA *et al.*, 2009).

A abordagem imunológica certamente tem potencial preventivo e terapêutico. A esse respeito, é notório que a defesa contra *S. aureus* depende primordialmente da imunidade inata por fagocitose e morte de bactérias por fagócitos, especialmente neutrófilos, que agem em conjunto com o sistema imune adaptativo. *Staphylococcus aureus* extracelular são engolfados e destruídos pelos fagócitos, e este processo é muito facilitado e intensificado pela ligação de anticorpos específicos. Nesse processo de fagocitose mediada por opsonização, os linfócitos T desempenham algumas funções cruciais, como: 1) os linfócitos T são importantes no processo de produção de anticorpos opsonizantes, pois são necessários para a maturação da afinidade do anticorpo e troca de classe; e 2) os linfócitos T promovem a fagocitose pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (BRÖKER; MROCHEN; PÉTON, 2011).

Além disso, *S. aureus* não é exclusivamente uma bactéria extracelular (BHARATHAN; MULLARKY, 2011; BRÖKER; MROCHEN; PÉTON, 2011; SOUZA *et al.*, 2016) e, conseqüentemente, a eliminação intracelular de *S. aureus* é

dependente de linfócitos T. Assim, há um consenso crescente de que os linfócitos T de memória apresentam contribuição essencial para o controle de *S. aureus* (MURPHY *et al.*, 2014; BRÖKER; MROCHEN; PÉTON, 2011; ZHANG *et al.*, 2018; ARMENTROUT; LIU; MARTINS, 2020). Na verdade, as deficiências das respostas de linfócitos T aumentam a suscetibilidade a infecções por *S. aureus* (BRÖKER; MROCHEN; PÉTON, 2011). Desta forma, investigações que mapeiam as respostas imunes de bovinos leiteiros que montaram uma resposta imune patógeno-hospedeiro bem-sucedidas pode abrir novos caminhos para potenciais alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas efetivas.

Diante deste cenário, o presente estudo investigou a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em animais com distintos históricos de mastite por *S. aureus*, vacinados ou não, e desta forma, pode nos trazer informações importantes da resposta de vacas leiteiras que montaram uma resposta imune efetiva e tiveram sucesso frente a infecção por este patógeno.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

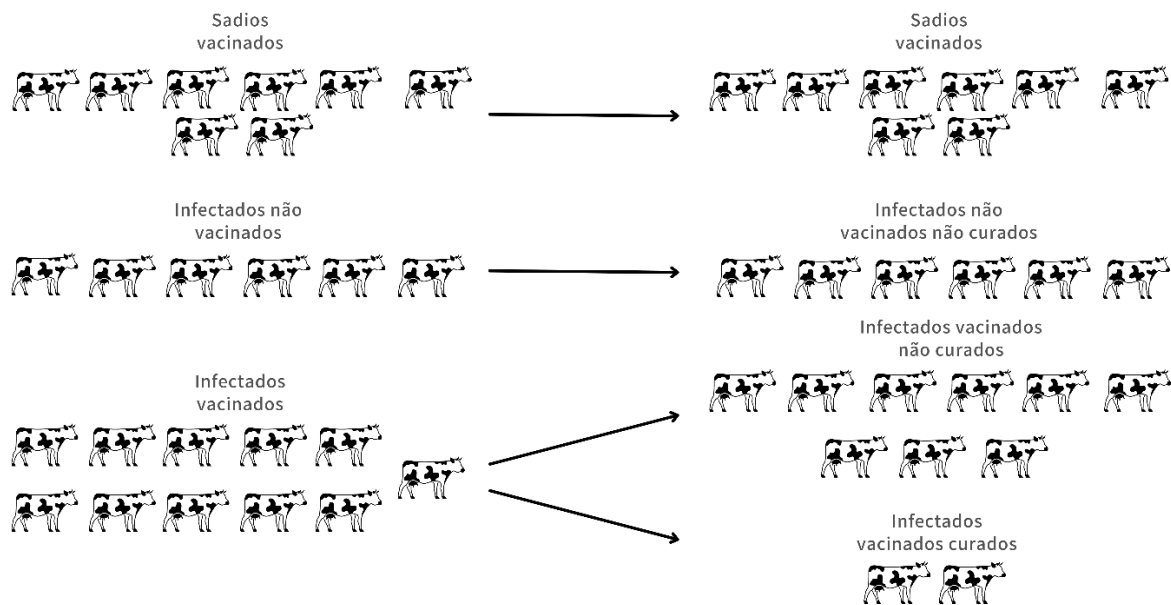
3.2.1 Rebanho

Para este estudo, foram usados 25 animais provenientes de de dois rebanhos comerciais (A e B) com aproximadamente 250 animais cadaque apresentavam, respectivamente, 15,75% e 24,80% de prevalência de animais infectados por *S. aureus* e com alta contagem de células somáticas (CCS) do leite no tanque de expansão ($\geq 500,000$ células mL⁻¹), como previamente descrito (CUNHA *et al.*, 2020). Precedente a ordenha que era realizada de forma mecanizada, era feito o descarte dos primeiros jatos de leite e observados em fundo escuro para detecção de mastite clínica, pré-*dipping* (0,5% de iodo titulável), secagem dos tetos com papel toalha, e posteriormente à ordenha, era realizado o pós-*dipping* (ácido láctico a 3,5% no rebanho A e com solução de iodo no rebanho B). Além desses procedimentos, também era feito terapia de vaca seca e tratamento dos casos clínicos de mastite. Os animais afetados com mastite causada por *S. aureus* eram segregados do restante do rebanho e ordenhados por último.

3.2.2 Animais, amostras e vacinação

Amostras de sangue periférico foram coletadas de 25 vacas leiteiras multíparas (segunda ou terceira lactação) holandesas em lactação, que foram posteriormente discriminados em seis grupos (Figura 2). Destacamos que os animais saudáveis não tinham histórico de mastite por *S. aureus* (histórico de mais de uma lactação de úbere sadio), conforme exame microbiológico do leite realizado mensalmente nos rebanhos estudados.

Figura 2. Grupos experimentais. IPV = infectado antes da vacinação, HPV = saudável antes da vacinação, INVI = infectado, não vacinado e continuou infectado, IVNC = infectado, vacinado e não foi curado, IVC = infectado, vacinado e curado, HVH = saudável, vacinado e continuou saudável.



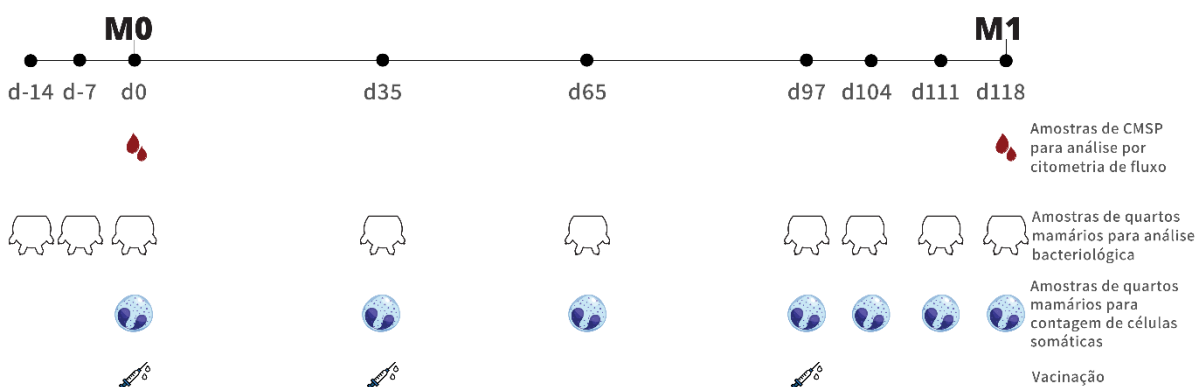
Fonte: Soares, 2022

Primeiro, foram identificadas 17 vacas infectadas por *S. aureus* logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina (IPV, momento 0, d0). Destas, 11 foram vacinadas e seis não foram vacinadas. O grupo dos animais vacinados foi subdividido no momento 1 (d118; 118 dias após à aplicação da primeira dose da vacina, e 21 dias após a terceira dose) em nove animais que não se curaram (IVNC) e dois que se recuperaram (IVC). No final do experimento (d118), outros dois grupos

foram identificados: as seis vacas que não foram vacinadas e permaneceram infectadas (INVI) e os oito indivíduos não infectados (HPV) que permaneceram com o mesmo *status* depois da vacinação (HVH). A vacina polivalente para mastite (STARTVAC; Hipra, Porto Alegre, Brasil) utilizada no presente estudo contém continha bacterinas para *S. aureus*, *Staphylococcus não-aureus* e *Escherichia coli*.

Os animais foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: (1) vacas com mais de 21 dias de lactação e data prevista para secagem maior que 150 dias, (2) nos resultados do exame bacteriológico do leite, e (3) na CCS, considerando o valor de corte de ≤ 200.000 células/mL para vacas sadias (SCHEPERS *et al.*, 1997; SCHUKKEN *et al.*, 2003). As escalas de tempo para: (1) coleta de sangue periférico para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP), (2) aplicação das três doses da vacina e (3) coleta das amostras de leite para exame bacteriológico e CSS estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3. Linha do tempo do protocolo vacinal, das coletas de amostras de leite para exame bacteriológico e contagem de células somáticas, e coleta de amostras de sangue periférico para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). d-14: 14 dias antes da aplicação da primeira dose da vacina; d-7: 7 dias antes da aplicação da primeira dose da vacina; d0: dia da aplicação da primeira dose da vacina; d35: dia da aplicação da segunda dose da vacina; d97: dia da aplicação da terceira dose da vacina; d104: 7 dias após a última dose da vacina ; d111: 14 dias após a última dose da vacina d118: 21 dias após a última dose da vacina.



Fonte: Soares (2022)

3.2.3 Definição de infecção intramamária

Uma amostra de leite foi definida como tendo infecção intramamária causada por *S. aureus* se, pelo menos uma colônia (≥ 100 UFC/mL), foi identificada no exame bacteriológico. A amostra também foi considerada positiva, e o quarto considerado como não curado se esse patógeno fosse isolado em pelo menos uma das duplicatas. Um quarto foi considerado como sadio no início do experimento quando os resultados dos exames bacteriológicos do leite realizados nos dois momentos antes da vacinação (d-14 e d-7) em amostras compostas de leite e das amostras de leite coletadas de cada quarto mamário (em duplicata) no dia da vacinação fosse negativo, além da CCS ≤ 200.000 células/mL em todos os quartos mamários no dia da vacinação. Uma infecção foi considerada como curada quando as amostras de leite de dois meses consecutivos ou três amostras semanais consecutivas não teve crescimento do agente etiológico da mastite no exame microbiológico, conforme anteriormente descrito (SCHUKKEN *et al.*, 2014).

3.2.4 Coleta de amostras de sangue

As amostras de sangue periférico foram coletadas assepticamente em tudo com heparina da veia epigástrica caudal superficial dos 25 animais no d0 (antes do início do protocolo vacinal) e d118 (21 dias depois da última dose de vacina). A análise das CMSP nos permitiu comparar a resposta celular das vacas infectadas e não infectadas antes e depois do protocolo de vacinação.

3.2.5 Coleta de amostras de leite

Primeiramente foi realizado o teste da caneca de fundo escuro para identificar os casos de mastite clínica em que havia alterações no leite, como a presença de grumos, coágulos e secreções anormais. Em seguida foi realizado o pré-*dipping* seguida da secagem dos tetos com toalhas de papel. Foi feito o descarte dos três primeiros jatos seguido da assepsia com álcool 70% da extremidade dos tetos para coleta asséptica em frascos estéreis. No caso da coleta de amostras composta, ela foi realizada duas vezes antes da vacinação (Figura 2). As amostras de leite coletadas de cada quarto mamário para exame bacteriológico (em duplicata) e CCS

foram coletadas assepticamente no d0 (início da vacinação), no d35 (segunda dose da vacina), d65, d97 (última dose do protocolo vacinal), d104, d111, e d118 após a primeira vacinação (Figura 2). Todas as amostras de leite foram mantidas a 4°C até sua chegada no laboratório e as amostras destinadas ao bacteriológico foram armazenadas a -20°C até sua análise.

3.2.6 Contagem de células somáticas

Para o presente estudo, 40 mL de leite composto e de cada quarto mamário foi coletado em frasco contendo micro-comprimidos de bronopol (2-bromo-2-nitropano-1,3-diol). As mensurações de CCS foram feitas através de um contador microscópico automático fluorescente de células somáticas (Somacount 300; Bentley Instrumentos, Chaska, MN).

3.2.7 Análise bacteriológica

A análise bacteriológica foi realizada a partir da cultura de 0,01 mL de cada amostra em placa de ágar sangue ovino a 5%. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 37°C, seguido pela coloração de Gram, observação da morfologia, padrões de hemólise e testes bioquímicos conforme anteriormente descritos (OLIVER *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2016). Os isolados de *S. aureus* foram posteriormente identificados e confirmados por espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voo (MALDI-TOF-MS) (SANTOS *et al.*, 2020).

3.2.8 Preparação do inóculo bacteriano

Para a preparação do inóculo bacteriano foi utilizada uma cepa de *S. aureus* isolada de caso de mastite subclínica persistente identificada por testes bioquímicos (SOUZA *et al.*, 2016), e confirmado por MALDI-TOF-MS e pela presença do gene *nuc* e *femA* (SOUZA *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020) e caracterizada por *spa typing* (SANTOS *et al.*, 2020).

O isolado foi congelado a -80°C e descongelado a 37 °C para seu uso. Primeiramente, foi feito o crescimento bacteriano em placas de ágar sangue

contendo 5% de sangue ovelha. Em seguida, as colônias frescas de bactérias foram submetidas a um novo cultivo em caldo de infusão de coração e cérebro (BHI) durante a noite a 37 °C. Posteriormente, foi feita a diluição de inóculo a 1:1000 em um caldo fresco de BHI e feita nova incubação até que as bactérias atingissem sua fase exponencial de crescimento. Após o crescimento bacteriano, o caldo com as bactérias foi centrifugado a 2.500 x g por 15 minutos, e lavado duas vezes com solução salina tamponada com fosfato estéril (DPBS; cat. n. 14190185, Gibco, Paisley, UK). Em seguida, foi feita a ressuspensão bacteriana em meio RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (cat. n. F9665, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). As bactérias foram inativadas pelo calor (30 minutos a 60 °C), no entanto, uma alíquota da suspensão de inóculo (sem inativação pelo calor) foi cultivada em diluição seriada em ágar tripton de soja, e as colônias foram contadas para confirmar a unidade formadora de colônias por mL, e posteriormente a concentração do inóculo foi ajustada para 2×10^7 UFC mL⁻¹. A suspensão bacteriana foi congelada a - 80 °C até o processamento.

3.2.9 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

Para proliferação de linfócitos, as CMSP foram isoladas de cada animal usando Ficoll-Paque™ Plus® (cat. n. 17-1440-03, GE Healthcare, EUA, gradiente de densidade 1,077 g mL⁻¹) seguindo as instruções do fabricante. Após a separação das CMSP, as células foram resuspensas em 1 mL do meio de cultivo celular RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFB; cat. n. F9665, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 5×10^{-2} mM 2-mercaptoetanol (cat. n. 21985-023, Invitrogen, Grand Island, EUA), suplementado com GlutaMAX™ (cat. n. 35050-061, GIBCO - Life Technologies, Grand Island, EUA) e solução antibiótico-antimicótica (cat. n. 15240-062, Life Technologies, Pasley, UK). A contagem de células viáveis foi inicialmente determinada por exclusão de azul *de Trypan* (cat. n. T8154-100ML, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em câmara de Neubauer, e sua concentração foi ajustada para $2,2 \times 10^6$ células viáveis mL⁻¹.

3.2.10 Cultura de CMSP

As CMSP (2×10^5 células por poço) foram cultivadas por 72 h em triplicata em placas de cultura de 96 poços na ausência (controle, basal) e na presença de *S. aureus* isolada de infecção intramamária persistente (10 bactérias por célula). As células foram posteriormente coletadas e centrifugadas a $250 \times g$ por 8 min, para posterior determinação da proliferação dos linfócitos T.

3.2.11 Proliferação de distintas subpopulações de linfócitos

Após as CMSP foram incubadas por 72 h a 37°C em incubadora com 5% de CO_2 , as amostras foram coletadas e centrifugadas a $250 \times g$ por 8 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior análise de citocinas. Em seguida, as células foram ressuspensas em $100 \mu\text{L}$ PBS suplementado com 1% (v/v) de SFB e incubado por 30 min a temperatura ambiente com uma combinação dos seguintes anticorpos monoclonais primários (mAbs): CD4 (clone GC50A, cat. n. BOV2011, Washington State University Monoclonal Antibody Center, EUA), CD8 (clone 7C2B, cat. n. BOV2019, Washington State University Monoclonal Antibody Center, EUA), CD45RO (clone GC42A, cat. n. BOV2043, Washington State University Monoclonal Antibody Center, EUA), CD44 (clone BAG40A, cat. n. BOV2037, Washington State University Monoclonal Antibody Center, EUA) e CD62L conjugado com ficoeritrina (PE; clone FMC46, cat. n. MCA1076PE, Biorad, Reino Unido) segundo descrito na Tabela suplementar 1. Portanto, no presente estudo, as células de memória (CD45RO^+) puderam ainda ser segregadas em duas distintas populações: linfócitos de memória efetora ($\text{CD44}^{\text{high}} \text{CD62L}^{\text{low}}$) que exercem rápido efeito efetor, porém com baixa capacidade proliferativa, e linfócitos de memória central ($\text{CD44}^{\text{high}} \text{CD62L}^{\text{high}}$) sem rápida ação efetora, com alto potencial de proliferação (VAN FAASSEN *et al.*, 2005; KRISHNAN *et al.*, 2007).

Em seguida, as células foram centrifugadas a $250 \times g$ por 8 min, e resuspensas em $100 \mu\text{L}$ de PBS com 1% de (SFB), e então incubadas durante 30 min com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. Os anticorpos

secundários utilizados foram: rato anti-IgM de camundongo conjugado com Alofocianina (cat. n. 550676, BD Biosciences, EUA), cabra anti-IgG2a de camundongo conjugado com violeta brilhante 421 (BV421; BD Horizon™, EUA), cabra anti-IgG1 de camundongo conjugado com PE-Texas-Red (cat. n. M32017, ThermoFisher, EUA) e cabra anti-IgG3 de camundongo conjugado com PE-Cy7 (cat. n. 1100-7, Southern Biotechnology, EUA). Após a incubação, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% e permeabilizadas em solução de permeabilização (0,1% de saponina em PBS com 1% de SFB e 0,09% de azida sódica). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 h a 4 ° C com anticorpo anti-Ki67 (cat n. ab15580, abcam, Cambridge, Reino Unido) diluído 1/10 em PBS com 1% de SFB e 0,09% de azida de sódio para quantificar a proliferação de linfócitos (SOARES *et al.*, 2010; LAŠŤOVIČKA; RATAJ, BARTŮŇKOVÁ, 2016). No presente estudo, a proliferação de linfócitos avaliada pela expressão de Ki67 foi empregada por apresentar resultados comparáveis quando avaliada utilizando o *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE), porém com resultados mais robustos e sensíveis (LAŠŤOVIČKA; RATAJ, BARTŮŇKOVÁ, 2016). Em seguida, 1 mL de solução de permeabilização foi adicionado à suspensão de células e centrifugado a 250 x g por 8 min. Então, as células foram novamente incubadas por mais 30 minutos com anticorpo anti-coelho IgG conjugado com isotiocianato (FITC; 1/100 em PBS com 1% SFB e 0.09% azida de sódio; cat. n. ab6717, Abcam). Finalmente, 1 mL de solução de permeabilização foi adicionado à suspensão de células e centrifugado a 250 xg por 8 min ressuspenso em PBS / 1% (v / v) SFB, e ressuspenso com 300 µL da solução de PBS e analisado por citometria de fluxo (BD LSRFortessa™ X-20, Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA). Aqui, 50.000 células, excluindo a maioria dos resíduos celulares, foram analisadas. Um controle sem coloração e amostras com coloração única também foram preparados como controles de compensação. As amostras de controle negativo também foram coradas com anticorpos de controle isotópico conjugado e apenas o anticorpo secundário conjugado. Além disso, as células foram coradas com controles de fluorescência menos um (FMO).

3.2.12 Análise estatística

Através do uso de explorações gráficas (boxplots e gráficos de pontos) e regressões lineares estudou-se a interação entre as variáveis dependentes, as células avaliadas por meio da citometria de fluxo, e variáveis independentes de interesses, vacinação, infecção e momento. Dado o volume de variáveis dependentes e conseqüente risco de ocorrências de erro tipo I a regressão linear foi utilizada como ferramenta exploratória, onde os coeficientes das variáveis dependentes que resultaram significativos foram graficamente apresentados e avaliados qualitativamente pelos pesquisadores a fim de se investigar as possíveis relações causais destes resultados.

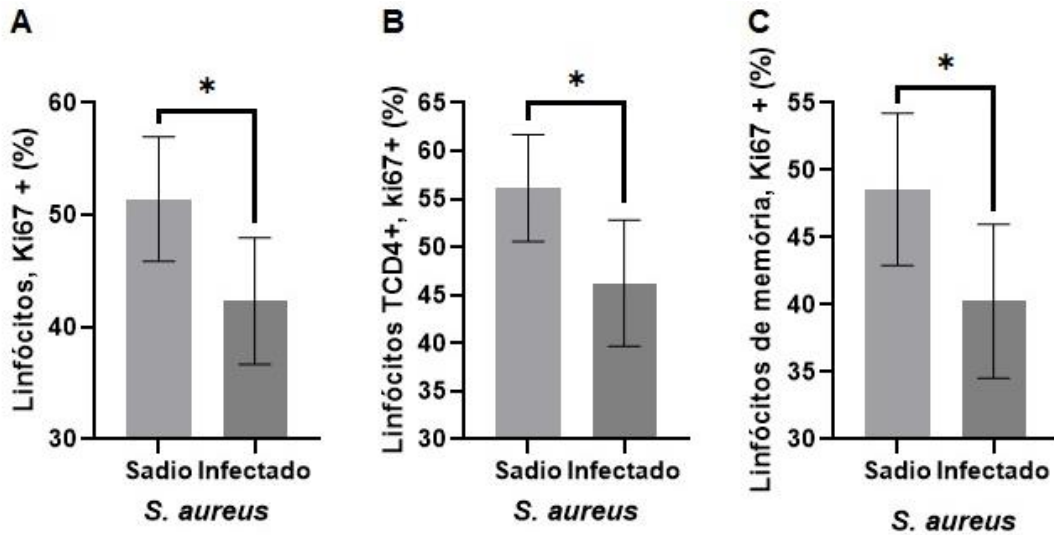
Para todas as análises realizadas utilizou-se $\alpha = 5\%$. Para todas as análises utilizou-se o programa R (R Core Team, 2021) e os pacotes tidyverse (WICKHAM, 2019) e broom (ROBINSON; HAYES; COUCH, 2021).

Para a comparação entre os seis grupos experimentais, normalidade e a homoscedasticidade dos dados foram inicialmente avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados com distribuição normal, serão avaliados pela ANOVA seguido pelo teste SNK, enquanto aqueles com distribuição não paramétrica serão avaliados pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's, utilizando programa estatístico GraphPad Prism 9.1. (GraphPad Prism, EUA).

3.3 RESULTADOS

No presente estudo foi possível observar que vacas com mastite subclínica persistente por *S. aureus* apresentaram menor proliferação de linfócitos, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos de memória quando estimulados com isolado de *S. aureus* isolado de infecção intramamária (Figura 4), no entanto não foi encontrada nenhuma diferença estatística na proliferação de linfócitos sanguíneos sem estímulo (basal; $P > 0.05$) entre animais sadios e infectados por *S. aureus*.

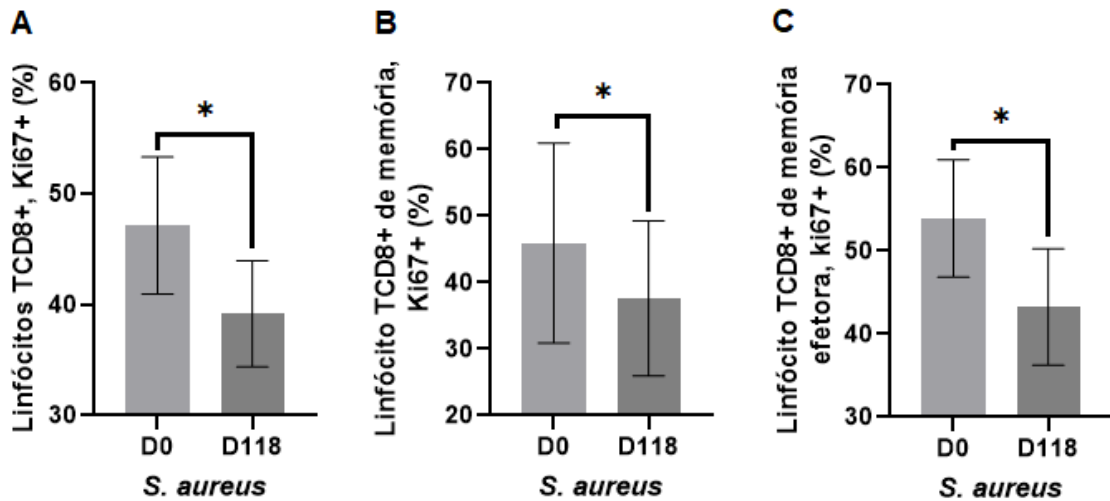
Figura 4. Vacas leiteiras com infecção intramamária por *S. aureus* apresentam menor capacidade proliferativa de linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺, e linfócitos de memória (CD45RO⁺) quando estimulados com *S. aureus*. $P \leq 0,05$.



Fonte: Soares (2022)

Além disto, observamos que no momento 0 (d0) a proliferação de linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ de memória e linfócitos T CD8⁺ de memória efetora foi maior que no momento 1 (d118) (Figura 5), no entanto não foi encontrada nenhuma diferença estatística na proliferação de linfócitos sanguíneos sem estímulo (basal; $P > 0,05$) entre os momentos analisados. Ademais, nenhum efeito da vacinação na proliferação das populações de linfócitos sanguíneos foi observado.

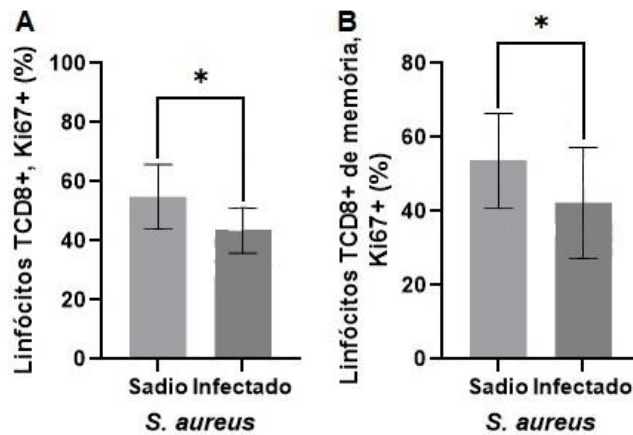
Figura 5. Proliferação dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD8⁺ de memória (CD45RO⁺) e linfócitos T CD8⁺ de memória efetora (CD45RO⁺ CD44^{high} CD62L^{low}) quando estimulados com *S. aureus* no momento 0 (d0; logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina) e momento 1 (d118; 118 dias após à aplicação da primeira dose da vacina, e 21 dias após a terceira dose). $P \leq 0,05$.



Fonte: Soares (2022)

Quando comparamos os animais de acordo com seu *status* sanitário no momento 0 (d0), pudemos observar que os animais com infecção intramamária por *S. aureus* (IPV) apresentaram menores percentuais de proliferação de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ de memória quando estimulados *S. aureus* (Figura 6).

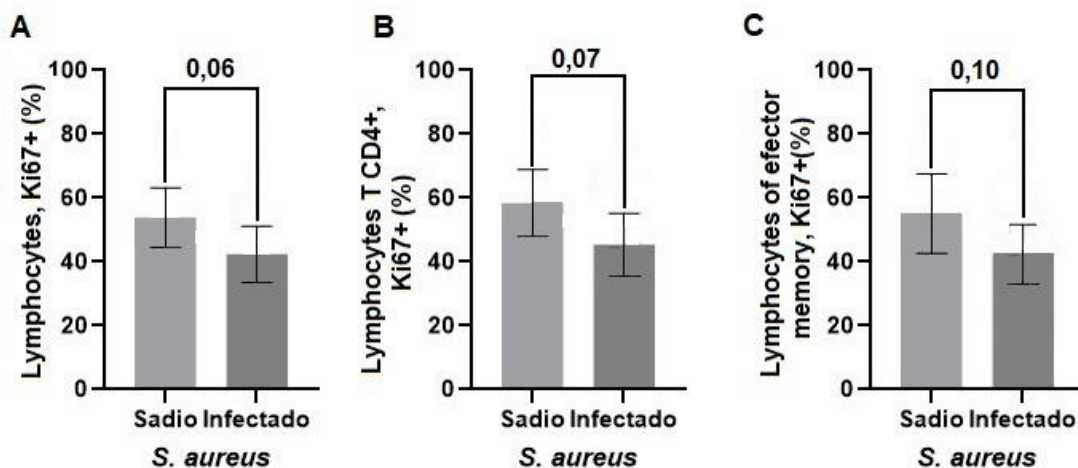
Figura 6. Vacas leiteiras com infecção intramamária por *S. aureus* apresentam menor capacidade proliferativa de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ de memória (CD45RO⁺) quando estimulados com *S. aureus* no momento 0 (d0; logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina). $P \leq 0,05$



Fonte: Soares (2022)

Além disto, observamos uma tendência a menor proliferação de linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺, e linfócitos memória efetora nos animais infectados (IPV) quando estimulados com *S. aureus* (Figura 7).

Figura 7. Proliferação de linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos de memória efetora (CD45RO⁺ CD44^{high} CD62L^{low}) em animais sadios e com infecção intramamária por *S. aureus* no momento 0 (d0; logo anterior à aplicação da primeira dose da vacina). $P \leq 0,05$.



Fonte: Soares (2022)

No entanto, não foi observado diferenças estatísticas na proliferação de linfócitos sanguíneos sem estímulo (basal; $P > 0,05$), assim como não houve diferenças estatísticas no momento 1 (d118) tanto na proliferação de linfócitos estimulados com *S. aureus* quanto sem estímulo (basal).

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, considerando o histórico de alta prevalência de *S. aureus* e alta CCS no leite de tanque nos rebanhos estudados, nosso desenho experimental com a comparação da resposta de linfócitos T em animais sadios que foram expostos ao patógeno (dado pela produção de anticorpos específicos contra *S. aureus*; CUNHA *et al.*, 2020) e permaneceram sadios com animais que não permaneceram sadios (infectados por *S. aureus*) pode nos ajudar a identificar respostas imunes associadas a resistência à infecção, ou seja respostas imunes que conferem proteção contra este patógeno, aqui avaliação pela capacidade de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e sua população de memória, estimulados ou não com *S. aureus* isolado de caso de mastite persistente.

A proliferação de linfócitos é um importante processo de formação de memória imunológica e imunidade protetora dos indivíduos (ROSENBERG, 1997; COMBADIÈRE *et al.*, 2004; SOARES *et al.* 2010) além de indicar a funcionalidade das células T (SOARES *et al.* 2010). No presente estudo observamos a diminuição da proliferação de linfócitos sanguíneos totais nos animais infectados por *S. aureus* em relação os animais sadios, quando estimulados com *S. aureus* isolado de caso de mastite persistente. Estudos anteriores descrevem resultados semelhantes aos encontrados no nosso trabalho, sugerindo que a infecção por *S. aureus* em bovinos inibe a proliferação de linfócitos totais encontrados tanto no leite quanto no sangue (NONNECKE, 1985; 1988).

Um importante achado do presente estudo foi a inibição da proliferação de linfócitos T CD4⁺ quando estimulados por *S. aureus* em vacas com mastite por este patógeno, o que pode favorecer a persistência da infecção intramamária associada a este patógeno, já que os linfócitos T CD4⁺ estão associados eliminação infecções bacterianas (DUNKLEY; CLANCY; CRIPPS, 1994; RIVAS *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2020). Além disto, estudos anteriores mostraram que vacas leiteiras com maior

susceptibilidade à infecção determinada por halotipos do complexo de histocompatibilidade bovino (BoLa), a maioria delas infectadas por *S. aureus*, apresentaram menor proporção de linfócitos T CD4⁺ em suas secreções da glândula mamária do que aquelas consideradas mais resistentes à mastite (PARK *et al.*, 2004), o que pode explicar ao menos parte de nossos achados. Além disto, a menor capacidade de proliferação de linfócitos T CD4⁺ da secreção mamária de animais infectados por *S. aureus* também já foi também descrita, sendo parcialmente mediada pelo efeito supressor de linfócitos T CD8⁺ e menor eficiência apresentação de antígenos (PARK *et al.*, 1993). No presente estudo observamos que a infecção intramamária por este patógeno também ocasionou menor resposta proliferativa de linfócitos T CD4⁺ sanguíneos, o que nos levou a hipótese de que fatores individuais dessas vacas (ex. fatores genéticos) desempenham papel importante na persistência da infecção ou sua cura. Assim, nossos achados reforçam a ideia de que uma resposta de T CD4⁺ abaixo do ideal pode estar associado à maior susceptibilidade a mastite por *S. aureus*.

Além disto, nosso estudo demonstrou que vacas com mastite subclínica por *S. aureus* apresentaram menor proliferação de células T de memória, o que pode ser explicado pela capacidade do *S. aureus* de inibir mecanismos que estabelecem a memória imunológica (TEYMOURNEJAD; MONTGOMERY, 2021), o que também pode explicar por que infecções anteriores por *S. aureus* geralmente não conferem proteção para infecções subsequentes e seu desafio de desenvolver uma vacina eficaz contra esse patógeno. De fato, nenhum efeito da vacinação na proliferação de linfócitos T foi observado, o que explica porque em condições de campo esta vacina comercial não confere proteção contra novas infecções intramamárias por este patógeno (LANDIN *et al.*, 2015; Rainard, 2021). Um dos grandes desafios para estabelecer a memória imunológica contra *S. aureus* é que os peptídeos imunodominantes podem não desencadear respostas protetoras de células T de memória e anticorpos, o que também poderia nos ajudar a explicar nossos achados. Neste cenário, uma resposta robusta contra epítomos imunodominantes não protetores pode ser gerada às custas de uma resposta contra epítomos mais protetores, mas subdominantes. Assim, usando essas mesmas vacas leiteiras em

estudo anterior (CUNHA *et al.*, 2020), em abordagem de imunoproteômica utilizando utilizando soro sanguíneo observamos usando análise soroimunoproteômica que as vacas leiteiras infectadas por *S. aureus* produziram anticorpos contra 11 proteínas estafilocócicas distintas (provavelmente relacionadas a epítomos imunodominantes reconhecidos por vacas leiteiras suscetíveis) que não foram reconhecidos por vacas leiteiras saudáveis, enquanto os animais saudáveis produziram anticorpos contra duas proteínas estafilocócicas distintas que não foram reconhecidas por vacas leiteiras infectadas por *S. aureus*. No geral, esses achados sugeriram que ocorrem variações entre as vacas leiteiras no processamento e apresentação de antígenos para as células T, na diferenciação e na proliferação de subconjuntos de células T de memória e efetoras entre as vacas, o que, poderia determinar sua suscetibilidade à doença. Assim, mais estudos são necessários para testar esse conceito, o que nos ajudará profundamente no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra as infecções intramamárias por *S. aureus* em bovinos. Portanto, para seguirmos em frente com nosso conhecimento, é crucial priorizar a descoberta de anticorpos e respostas de células T que conferem proteção contra infecção por *S. aureus*, e o uso de animais pré-expostos, como os usamos neste trabalho, em vez de animais sem contato seria um modelo mais interessante (TEYMOURNEJAD; MONTGOMERY, 2021).

Ademais, observamos que aos 118 dias após a primeira coleta, os animais infectados apresentaram menor proliferação de linfócitos T CD8⁺, especialmente da população de linfócitos T CD8⁺ de memória. Neste contexto, Ziegler *et al.* (2011) demonstrou progressiva redução da resposta de células T frente aos antígenos de estafilococos na infecção por *S. aureus* da fase aguda a infecção persistente, o que determinou que estas células entrassem num estado anérgico e de imunossupressão, que pode estar associado à falha da imunidade “esterilizante” favorecendo as infecções persistentes de longa duração (ZIEGLER *et al.*, 2011)

3.5 CONCLUSÃO

O presente estudo reforçou a ideia de que a regulação negativa da resposta de células T é crucial para a persistência das infecções intramamárias por *S. aureus*. Ademais, considerando a importância das células T para a proteção contra as

infecções por *S. aureus*, a ausência da resposta vacinal na proliferação de linfócitos T encontrado no presente estudo pode justificar a insatisfatória resposta a vacinação encontrada a campo, cuja resposta baseia-se primordialmente na proteção mediada por anticorpos.

3.6 REFERÊNCIAS

ARMENTROUT, E. I.; LIU, G. Y.; MARTINS, G. A. T cell immunity and the quest for protective vaccines against *Staphylococcus aureus* infection. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1936, 2020.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.

BERUBE, Bryan J.; WARDENBURG, Juliane Bubeck. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1140-1166, 2013.

BHARATHAN, M; MULLARKY, I. K. Targeting mucosal immunity in the battle to develop a mastitis vaccine. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 409-419, 2011.

BRÖKER, B. M.; MROCHEN, D; PÉTON, V. The T cell response to *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 31, 2016.

COMBADIÈRE, Behazine et al. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN- γ -producing T cell memory to smallpox in humans. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 11, p. 1585-1593, 2004.

CUNHA, A. F. et al. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy and infected dairy cows with a distinct mastitis history and vaccinated with a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4588-4605, 2020.

CUNHA, P. et al. Expansion, isolation and first characterization of bovine Th17 lymphocytes. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

DE VliegHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, 2012.

DUFOUR, S. et al. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1283-1300, 2012.

DUNKLEY, M. L.; CLANCY, R. L.; CRIPPS, A. W. A role for CD4+ T cells from orally immunized rats in enhanced clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. **Immunology**, v. 83, n. 3, p. 362, 1994.

ELNAGGAR, M. M. *et al.* Characterization of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell subsets expressing IL-17A in ruminants and swine. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 85, p. 115-124, 2018.

FERGUSON, J. D. *et al.* Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5798-5813, 2007.

HALASA, T. et al. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 2. Cure of existing intramammary infections. **Journal of Dairy science**, v. 92, n. 7, p. 3150-3157, 2009.

HARP, James A.; NONNECKE, Brian J. Regulation of mitogenic responses by bovine milk leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 11, n. 3, p. 215-224, 1986.

HOGVEEN, H.; VAN DER VOORT, M. Assessing the economic impact of an endemic disease: the case of mastitis. **Revue scientifique et technique/Office International des Epizooties**, v. 36, n. 1, p. 217-226, 2017.

HOSPIDO, A; SONESSON, U. The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. **Science of the total environment**, v. 343, n. 1-3, p. 71-82, 2005.

JING, X. *et al.* Pivotal Role of IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in Mouse Chronic Mastitis Experimentally Induced with *Staphylococcus Aureus*. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, vol. 7, n. 12, p. 1266–1278, 2012

KRISHNAN, L. *et al.* Rapid clonal expansion and prolonged maintenance of memory CD8+ T cells of the effector (CD44^{high}CD62L^{low}) and central (CD44^{high}CD62L^{high}) phenotype by an archaeosome adjuvant independent of TLR2. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2396-2406, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2396>

LANDIN, H. *et al.* Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2015.

LAŠŤOVIČKA, J. *et al.* Assessment of Lymphocyte Proliferation for Diagnostic Purpose: Comparison of CFSE Staining, Ki-67 Expression and 3H-Thymidine Incorporation, **Human Immunology**, v. 77, n. 12, 2016

LEE, J. *et al.* Induction of immunosuppressive CD8⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells by suboptimal stimulation with staphylococcal enterotoxin C1. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 2, p. 669-680, 2018.

LOEFFLER, D. A.; SCHAT, K. A.; NORCROSS, N. L. Use of ⁵¹Cr release to measure the cytotoxic effects of staphylococcal leukocidin and toxin neutralization on bovine leukocytes. **Journal of clinical microbiology**, v. 23, n. 3, p. 416-420, 1986.

MURPHY, A.G. *et al.* *Staphylococcus aureus* Infection of Mice Expands a Population of Memory $\gamma\delta$ T Cells That Are Protective against Subsequent Infection. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3697–708, 2014.

NONNECKE, B. J.; HARP, J. A. Effects of *Staphylococcus aureus* on bovine mononuclear leukocyte proliferation and viability: modulation by phagocytic leukocytes. **Journal of Dairy science**, v. 71, n. 3, p. 835-842, 1988.

NONNECKE, B. J.; HARP, J. A. Effect of chronic staphylococcal mastitis on mitogenic responses of bovine lymphocytes. **Journal of Dairy science**, v. 68, n. 12, p. 3323-3328, 1985.

OLIVER, S.P. *et al.* Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. **National Mastitis Council**, Verona, WI, 2004.

ØSTERÅS, O. *et al.* Results and evaluation of thirty years of health recordings in the Norwegian dairy cattle population. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4483-4497, 2007.

PARK, Y. H. *et al.* Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 29-39, 2004.

PARK, Y. H. *et al.* Suppression of proliferative response of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, n. 2, p. 137-151, 1993.

PIEPERS, S. *et al.* Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy science**, v. 100, n. 1, p. 769-782, 2017.

RAINARD, P. *et al.* Type 3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. **Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 1-8, 2020.

RAINARD, P. *et al.* Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 149-165, 2018.

RIVAS, A. L. *et al.* Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 232, 2000.

ROBINSON D, H. *et al.* broom: Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles [Internet]. R-Packages. 2021. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=broom>

ROSENBERG, E. S. *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, v. 278, n. 5342, p. 1447-1450, 1997.

SANTOS, R. P. *et al.* Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2143, 2020.

SCHEPERS, A. J. *et al.* Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1833-1840, 1997.

SCHUKKEN, Y. H. *et al.* Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. **Journal of Dairy science**, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, 2014.

SCHUKKEN, Y. H., *et al.* Monitoring Udder Health and Milk Quality Using Somatic Cell Counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579–596, 2003

SOARES, A. *et al.* Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. **Journal of immunological methods**, v. 362, n. 1-2, p. 43-50, 2010.

SOUZA, F. N. *et al.* Immune response in nonspecific mastitis: What can it tell us?. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5376-5386, 2020.

SOUZA, F. N. *et al.* Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 811-818, 2016.

TAPONEN, S. *et al.* Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 493-503, 2017.

TENHAGEN B-A. *et al.* Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 7, p. 2542–51, 2006.

TEYMOURNEJAD, O.; MONTGOMERY, C. P. Evasion of immunological memory by *S. aureus* infection: implications for vaccine design. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 430, 2021.

The R Foundation. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. R-project.org. 2019. Available from: <https://www.r-project.org/>

VAN FAASSEN, H. *et al.* Reducing the stimulation of CD8+ T cells during infection with intracellular bacteria promotes differentiation primarily into a central (CD62L^{high}CD44^{high}) subset. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5341-5350, 2005. Doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5341

WATTEGEDERA, S. R. *et al.* Enhancing the toolbox to study IL-17A in cattle and sheep. **Veterinary research**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2017.

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*. 2019 Nov 21;4(43):1686

ZHANG, L. *et al.* Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. **BMC Veterinary Research**. v. 14, n. 1, p. 1-12, 2018

ZIEGLER, C. *et al.* The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. **EMBO molecular medicine**, v. 3, n. 11, p. 652-666, 2011.

4. CONSIDERAÇÕES

O presente estudo indica que variações na resposta imune entre animais fenotipicamente distintos, aqui avaliado pela proliferação de linfócitos T, podem estar associados à susceptibilidade ou resistência à infecção por *S. aureus*. Ademais, nossos achados corroboram com a importância da resposta T nas infecções intramamárias por *S. aureus*, portanto esta resposta deve ser avaliada em estudos de desenvolvimento e eficácia de novas vacinas para as infecções intramamárias em bovinos, como aquelas causadas por *S. aureus*, onde a resposta humoral não é suficiente para conferir proteção contra novas infecções

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS – INTRODUÇÃO & REVISÃO

BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., & ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.

BIRGEL JUNIOR, E. H. Formas clínicas das mamites dos bovinos. **Revista Brasileira de Buiatria**, v. 1, n. 4, p. 100 – 123, 2021.

BOUGARN, S. *et. al.* Staphylococcal-associated molecular patterns enhance expression of immune defense genes induced by IL-17 in mammary epithelial cells. **Cytokine**, v.56, p.749-759, 2011.

BRÖKER, B. M., MROCHEN, D., PETON, V. The T cell response to *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 31, 2016.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; LEITE, M.O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. **Cad. Tec. Vet. Zootec.**, v. 13, p. 39-65, 1995.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educ. Cont. Vet. Med. Zootec.**, v. 1, p. 3-7, 1998.

CUA, D.J.; TATO, C.M. Innate IL-17-producing cells in lung immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.479-489, 2010.

DE VliegHER, S. OHNSTAD, I., PIEPERS, S. Management and prevention of mastitis: a multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. **Journal of Integrative Agriculture**, v.17, n.6, p.1214-1233, 2018.

DENIS, M., *et al.* Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: What is the best way forward? **New Zealand veterinary journal**, v. 57, n. 3, p. 132-140, 2009.

DINGWELL, R. T., *et.al.* Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 1, p. 159-168, 2003.

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 33, p. 1-12, 2002.

FATTOM, A. I. *et al.* Development of StaphVax, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. **Vaccine**, v.22, n.7, p.880-887, 2004.

FETROW, J. *et al.* Production losses from mastitis: carryover the preceding lactation. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 833-839, 1991.

FISCHER, A. Connecting STAT3, Th17 and human mucosal immunity. **Immunology and Cell Biology**, v.86, p.549-551, 2008.

FORSBÄCK, L., *et al.* Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. **Animal**, v. 4, n. 4, p. 617-626. 2010.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-958, 2005.

FOSTER, T.J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Immunology**, v.12, p.49-62, 2014.

HALASA, T. *et al.* Stochastic bio-economic model of bovine intramammary infection. **Livestock Science**, v. 124, n. 1-3, p. 295-305, 2009.

IWAKURA Y. *et al.* The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, v.226, p.57- 79, 2008.

JANSEN, K. U. *et al.* Vaccine review: “*Staphylococcus aureus* vaccines: problems and prospects”. **Vaccine**, v.31, p.2723-2730, 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p

KEHRLI, M.E. *et al.* Effects of granulocyte colony stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacteria shedding. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2448-2458, 1991.

KIMURA, K. *et al.* Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.97, 4842-4851, 2014.

KOLATA, J. B. *et al.* The fall of a dogma? Unexpected high T-cell memory response to *Staphylococcus aureus* in humans. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 5, p. 830-838, 2015.

KOLLS, J.K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, p.467-476, 2004.

LAGO, A. *et al.* The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011.

LANDIN, H., *et al.* Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2015.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LIN, L.; *et al.* Th1-Th17 cells mediate protective adaptative immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **Plos Pathogens**, v.5, e1000703, 2009.

LOPES, *et al.* Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. *Arq. Inst. Biol.*, v.78, n.4, p.493-499, 2011.

LOPES, *et al.* Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. *Arq. Inst. Biol.*, v.79, n.4, p.477- 483, 2012.

MANIATI, E.; SOPER, R.; HAGEMANN, T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in tumor microenvironment. **Oncogene**, v.29, p.5653-5662, 2010.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 36, p. 101-116, 2005.

MIDDLETON, J. R.; LUBY, C. D.; ADAMS, D. S. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 192-198, 2009.

MINEGISHI, Y.; KARASUYAMA, H. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: lessons from a primary immunodeficiency. **International Immunology**, v.21, p.105-112, 2009.

MURPHY, A.G *et al.* *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory $\gamma\delta$ T cells that are protective against subsequent infection. **Journal of Immunology**, v.192, p.3697-3708, 2014.

MURRAY, P.R.; *et al.* **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 604 p

NIEBUHR, M. *et al.* Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. **Infection and Immunity**, v.79, p.1615-1622, 2011.

OWENS, W. E. *et al.* Antibiotic treatment of mastitis: comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. **Journal of Dairy science**, v. 71, n. 11, p. 3143-3147, 1988.

PAAPE, M.J. *et al.* The bovine neutrophil: structure and function. **Veterinary Research**, v. 34, p. 597-627, 2003.

PHILPOT, W. N., NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Westfalia Landtechnik do Brasil, 2000.

PIEPERS, S. *et al.* Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 769-782, 2017.

PILLAI, S. R. *et al.* Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1413-1420, 2001.

PINHEIRO, E. S. C. Eficiência do tratamento e vacinação de mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*. Dissertação (Mestrado em Produção e nutrição animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

PROCTOR, R.A. Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? Review. **Vaccine**, v.30, p.2921-2927, 2012.

PUEL, A. *et.al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. **Science**, v.332, p.65-68, 2011.

PUMIPUNTU, N. *et al.* Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. **Veterinary World**, v. 10, n. 7, p. 721, 2017.

RAINARD, P. *et al.* T helper 17-associated are produced during antigen-specific inflammation in the mammary gland. **Plos One**, v.8, e63471, 2013.

RAINARD, P. *et al.* Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary Emerging Diseases**, v. 65(Suppl. 1), p. 149–165, 2018.

REKSEN, O. *et al.* Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy science**, v.

89, n. 8, p. 2928-2937, 2006.

REKSEN, O.; SØLVERØD, L.; ØSTERÅS, O. Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy science**, v. 90, n. 10, p. 4670-4678, 2007.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Kinetics of cells and cytokine during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systematic immunized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. **Inflammation Research**, v. 49, n. 9, p. 486-496, 2000.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Dairy science**, v. 84, n. 5, p. 1077-1084, 2001.

ROBERSON, J. R. Clinical Mastitis. In: **American Association of Bovine Practitioners Proceedings of the Annual Conference**. p. 124-133, 2010.

ROYSTER, E., WAGNER, S. Treatment of mastitis in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17-46, 2015

RUEGG, P.L. A 100-Year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p.10381-10397, 2017.

SCHUKKEN, Y. H. *et al.* Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, 2014.

SHKRETA, L.; TALBOT, B.G.; DIARRA, M.S.; LACASSE, P. Immune response to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. **Vaccine**, v.23, p.114-126, 2004.

SOL, J. *et al.* Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy science**, v. 80, n. 11, p. 2803-2808, 1997.

SOLTYS, J.; QUINN, M.T. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6293-6302, 1999.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

SORDILLO, L.M.; BABIUK, L.A. Modulation of mammary gland neutrophil function during the periparturient period following *in vivo* exposure to recombinant

interferon-gamma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 27, p. 393-402, 1991.

SOUZA, F. N. *et al.* The innate immunity in bovine mastitis: the role of pattern-recognition receptor. **American Journal of Immunology**. v. 8, n. 4, p. 166-178, 2012.

SPELLBERG, B.; DAUM, R. A new view on development of *Staphylococcus aureus* vaccine. **Human Vaccine**, v.6, n.10, 857-859, 2010.

SUTRA, L. POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Med. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 79-89, 1994.

TALBOT, B. G., LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. **Livestock production science**, v. 98, n. 1-2, p. 101-113, 2005.

TEYMOURNEJAD, O; MONTGOMERY, C. P. Evasion of immunological memory by *S. aureus* infection: implications for vaccine design. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 430, 2021.

VERAS, J. F. *et al.* A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 410-415, 2008.

WEAVER, C.T. *et al.* Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, v.24, p.677-688, 2006.

WENZ, J. R.; GARRY, F. B.; BARRINGTON, G. M. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 2, p. 259-262, 2006.

WORKU, M.; PAAPE, M.J.; MARQUARDT, W.W. Modulation of Fc receptors for IgG on bovine polymorphonuclear neutrophils by interferon-gamma through de novo RNA transcription and protein synthesis. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.234- 238, 1994.

WORKU, M. *et al.* Effect of in vitro and in vivo migration of bovine neutrophils on binding and expression of Fc receptors for IgG2 and IgM. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 2, p. 221-226, 1994.

ZADOKS, R. N. *et al.* Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. **Journal of Dairy science**, v. 84, n. 3, p. 590-599, 2001.

6. APÉNDICE

Tabela suplementar 1: Anticorpos monoclonais (mAbs) usados para determinação da proliferação das distintas populações de linfócitos T.

Descrição	Anticorpo primário							Anticorpo secundário						
	cat. n.	tipo	Quantidade	Especificidade	Hospedeiro	Empresa	Isotipo	cat. n.	tipo	Quantidade	Especificidade	Hospedeiro	Empresa	Isotipo
Linfócito T CD4 ⁺	BOV2011	CD4	1 µL	Bovino	Camundongo	WSU ¹	IgM	550676	APC	1 µL	Camundongo	Cabra	BD ²	IgM
Linfócitos T CD8 ⁺	BOV2019	CD8	1 µL	Bovino	camundongo	WSU ¹	IgG2a	565817	BV421	1 µL	Camundongo	Cabra	BD ²	IgG2a
CD45RO ⁺	BOV2043	Memória	1 µL	Bovino	Camundongo	WSU ¹	IgG1	M32017	PE-Texas Red	1 µL	Camundongo	Cabra	TermoFisher	IgG1
CD44 ⁺	BOV2037	Glicoproteína transmembranar de superfície celular não quinase	1 µL	Bovino	Camundongo	WSU ¹	IgG3	1100-7	PE-Cy7	1 µL	Camundongo	Cabra	SB ³	IgG3
CD62L ⁺	MCA1076PE	L-selectin with R-PE marker	1 µL	Reação cruzada com bovinos	Camundongo	Biorad	IgG2b							
Ki67	ab15580	Marcador de Proliferação	0.1 µL	Reação cruzada com bovinos	Coelho	abcam	IgG	ab6717	FITC	1 µL	Coelho	Cabra	abcam	IgG

¹Washington State University Monoclonal Antibody Center; ²BD Biosciences; ³Southern Biotechnology; R-PE: R-ficoeritrina; APC: alofocianina; BV421: violeta brilhante 421; PE-Texas Red: ficoeritrina-*Texas Red*; PE-Cy7: ficoeritrina-cianina-7; FITC: isotiocianato de fluoresceína.

Fonte: Soares (2022)