

JUNNIA LUÍSA PENA

**APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS MAC-T INFECTADA POR
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* E BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**

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

Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Coorientadores: Abelardo Silva Júnior
David Germano G. Schwarz
Leandro Licursi de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

P397a
2024

Pena, Junnia Luísa, 1987-
Apoptose e necrose em células MAC-T infectada por
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* e bactérias causadoras
de mastite bovina / Junnia Luísa Pena. - Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Veterinária, 2024.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.696>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Mycobacterium avium*. 2. Bovinos - Doenças. 3.
Paratuberculose. 4. Mastite. 5. Sobrevivência celular. I. Moreira, Maria
Aparecida Scatamburlo, 1963-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.208969294

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552


JUNNIA LUÍSA PENA

**APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS MAC-T INFECTADA POR
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* E BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Meteorologia Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **JUNNIA LUISA PENA**
Data: 11/10/2024 16:45:21-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Junnia Luísa Pena
Autor

Documento assinado digitalmente
 **MARIA APARECIDA SCATAMBURLO MOREIRA**
Data: 12/10/2024 11:09:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
Orientadora

Ao meu esposo Mateus e à minha filha Maitê.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por todas as oportunidades concedidas, pela força diária e amparo nos momentos difíceis.

À Professora orientadora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, agradeço pelo apoio e disponibilidade incondicional, pela compreensão por algumas dilatações, pelo aconselhamento assertivo e pelo estímulo permanente, que muito contribuíram para minha formação, e também pela sua amizade.

À meu esposo Mateus, pelo amor, pelo apoio constante, incentivo e paciência, que durante esses anos se fez presente e me motivando, admirando, sendo essencial para com que eu pudesse finalizar essa etapa.

À minha filha amada Maitê pelo amor incondicional, por me tornar mãe durante esse processo, dando sentido à minha vida, me motivando a continuar e nunca desistir dos meus sonhos, e que hoje são todos em prol dela.

Aos meus pais e irmã, pelo amor e incentivo e apoio constante que sempre me deram. À minha avó Dalva (*in memoriam*) meu porto seguro a quem honro e dedico todas as minhas conquistas, que espiritualmente me dá forças, me ampara e me protege.

Aos meus co-orientadores, especialmente ao professor Leandro Licursi, pelos direcionamentos e disponibilidade, zelo e cuidado durante todos os processos e etapas para elaboração desse trabalho.

Ao professor e amigo Arthur William Brasil pela realização das análises estatísticas, pela disponibilidade e atenção, sempre muito paciente e dedicado a contribuir.

A amiga e colaboradora Karina Funabashi pela disponibilidade e auxílio com a realização dos ensaios moleculares, sempre muito solícita e dedicada a contribuir.

Aos amigos e colegas da pós graduação, pela amizade, acolhimento, apoio e incentivo para realização desse trabalho.

Ao LDBAC e os demais laboratórios onde realizei meus experimentos, e seus respectivos responsáveis, agradeço pela estrutura física, equipamentos, reagentes e meios que garantiram a realização desse projeto.

Aos técnicos e funcionários do departamento de Veterinária da UFRV por todo apoio constante na rotina dos laboratórios, especialmente ao Sr. Luís,

Marquinhos, Nívia e Rosi, que sempre estiveram dispostos a auxiliar, e prontamente a ajudar em todas as etapas desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realizar a pós-graduação, em especial ao coordenador Luís Augusto Nero, pela competência e organização, bem como pelo apoio financeiro na participação de eventos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Ensinar, mas fazer; crer, mas estudar;
aconselhar, mas exemplificar”.*
(Chico Xavier)

RESUMO

PENA, Junnia L., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Apoptose e necrose em células mac-t infectada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e bactérias causadoras de mastite bovina.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior, David Germano G. Schwarz e Leandro Licursi de Oliveira.

A paratuberculose bovina é uma doença infecciosa granulomatosa crônica de grande impacto econômico na pecuária leiteira. Dentre as perdas econômicas causadas pelo MAP o aumento da incidência de mastite é evidenciado, afetando a sanidade dos animais acometidos e intensificando as perdas na produção. Após passagem pelas células intestinais, MAP pode se espalhar para órgãos distantes como a glândula mamária, sendo o leite considerado a segunda via de eliminação desse patógeno. A saída de MAP de locais sistêmicos pode ser influenciada por um processo inflamatório preexistente, como a mastite. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade das células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T), diante das interações entre MAP e bactérias causadores de mastite bovina através da realização de uma revisão sobre os mecanismos de evasão de MAP no sistema imune dos hospedeiros, bem como pela realização ensaios de caspase 9, LDH, iodeto de propídio, e ensaios moleculares conferindo a expressão dos genes Bax e Bcl2 por qPCR em amostras de células MAC-T infectadas por três isolados de MAP (K10, ARG e RS) co-infectadas por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, submetidas a três tempos distintos, 4, 12 e 24 horas, realizadas em duas repetições biológicas. Foi possível observar maior liberação de caspase 9 em amostras de MAP-RS co-infectado por *S. agalactiae* no tempo 24 horas. Os ensaios de LDH demonstram ausência de necrose células nas amostras analisadas.. As amostras dos ensaios de infecção por MAP-K10 e MAP-ARG em células MAC-T demonstraram resultados significativos e uma maior marcação de iodeto de propídio, sendo mais evidente quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 no tempo de 24 horas. A expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 foi observada significativamente nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada por MAP-ARG co-infectado por *E. coli*. Quanto ao gene pró-apoptótico Bax foi observada a expressão

significativa nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada também por MAP-K10 porém co-infectado por *S. agalactiae*. A determinação dos genes Bax e Bcl2 proporcionou uma compreensão genotípica dos padrões inflamatórios, demonstrando um comprometimento apoptótico significativo em células MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*. Os ensaios in vitro induziram a inflamação das células MAC-T, uma vez infectadas por diferentes isolados de MAP e co-infectadas separadamente por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*, comprometendo a viabilidade dessas células, confirmada pela liberação de Caspase 9 e Iodeto de Propídio, indicando apoptose celular. Podemos concluir que quando infectadas por MAP e co-infectadas por bactérias causadoras de mastite bovina, as células MAC-T tiveram uma redução considerável em sua viabilidade celular.

Palavras-chave: co-infecção; glândula mamária; MAP; morte celular; viabilidade celular.

ABSTRACT

PENA, Junnia L., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2024. **Apoptosis and necrosis in mac-t cells infected by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and bacteria causing bovine mastitis.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior, David Germano G. Schwarz e Leandro Licursi de Oliveira.

Bovine paratuberculosis is a chronic granulomatous infectious disease with a major economic impact on dairy farming. Among the economic losses caused by MAP, the increased incidence of mastitis is evident, affecting the health of affected animals and intensifying production losses. After passing through intestinal cells, MAP can spread to distant organs such as the mammary gland, with milk being considered the second route of elimination of this pathogen. The elimination of MAP from systemic sites can be influenced by a preexisting inflammatory process, such as mastitis. Thus, the objective of this study was to evaluate the viability of bovine mammary gland epithelial cells (MAC-T) in the face of interactions between MAP and bacteria that cause bovine mastitis by reviewing the mechanisms of MAP evasion in the host immune system, as well as by performing caspase 9, LDH, propidium iodide assays, and molecular assays checking the expression of Bax and Bcl2 genes by qPCR in samples of MAC-T cells infected by three MAP isolates (K10, ARG and RS) co-infected by *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli*, subjected to three different times, 4, 12 and 24 hours, performed in two biological replicates. It was possible to observe greater release of caspase 9 in samples of MAP-RS co-infected by *S. agalactiae* at time 24 hours. The LDH assays demonstrated the absence of cell necrosis in the analyzed samples. The samples from the MAP-K10 and MAP-ARG infection assays in MAC-T cells demonstrated significant results and a higher propidium iodide labeling, which was more evident when MAC-T was infected with MAP-K10 for 24 hours. The expression of the anti-apoptotic gene Bcl2 was significantly observed in the samples with 24 hours, especially when MAC-T was infected with MAP-K10 without co-infection, followed by the MAC-T sample infected with MAP-ARG co-infected with *E. coli*. Regarding the pro-apoptotic gene Bax, significant expression was observed in the samples with 24 hours, especially when MAC-T was infected with MAP-K10 without co-infection,

followed by the MAC-T sample also infected with MAP-K10 but co-infected with *S. agalactiae*. The determination of Bax and Bcl2 genes provided a genotypic understanding of the inflammatory patterns, demonstrating a significant apoptotic impairment in MAC-T cells infected by MAP and co-infected with *E. coli*, *S. aureus* and *S. agalactiae*. In vitro assays induced inflammation in MAC-T cells, once infected by different MAP isolates and co-infected separately by *E. coli*, *S. aureus* and *S. agalactiae*, compromising the viability of these cells, confirmed by the release of Caspase 9 and Propidium Iodide, indicating cell apoptosis. We can conclude that when infected by MAP and co-infected with bacteria causing bovine mastitis, MAC-T cells had a considerable reduction in their cell viability.

Keywords: co-infection; mammary gland; MAP; cell death; cell viability.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
OBJETIVO GERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO I: Mecanismos e estratégias de evasão da resposta imune de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) em seus hospedeiros.....	14
CAPÍTULO II: Comprometimento apoptótico e necrótico em células MAC-T infectadas por <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) e co-infectadas por bactérias causadoras de mastite bovina.....	26
CONCLUSÃO GERAL.....	57

INTRODUÇÃO GERAL

A paratuberculose bovina também conhecida como Doença de Johnne, trata-se de uma infecção crônica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Johnne e Frothingham, 1895), caracterizada por diarreia e enterite persistentes, resultando em perdas econômicas significativas devido à redução da produção de leite e ao abate prematuro de animais infectados (Scarpellini et al., 2023).

Assim como a paratuberculose, a mastite bovina implica em perdas econômicas consideráveis (Sharun et al., 2021), classificada como contagiosa ou ambiental, causada principalmente por bactérias, onde *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* se destacam dentre os principais agentes etiológicos (Cadona et al., 2021).

Dentre as perdas econômicas causadas pelo MAP, como a redução da produção de leite, baixa eficiência reprodutiva, abate prematuro, aumento dos custos com terapias, o aumento da incidência de mastite é evidenciado (Pritchard et al., 2017, Rossi et al., 2017).

Considerando que MAP favorece a internalização e permanência dos agentes causadores da mastite na glândula mamária, suspeita-se de interações ainda não compreendidas possam favorecer a permanência desses patógenos, bem como interferindo nos tratamentos usuais destas enfermidades (Pena et. al., 2020).

Essas inter-relações bacterianas podem causar o insucesso dos tratamentos preconizados e até mesmo de forma indireta causar resistência bacteriana pela utilização indiscriminada de antibióticos, refletindo na sanidade dos animais, bem como em humanos (Kutzepa et. al., 2009).

Além do comprometimento na saúde humana existem os prejuízos e impactos consideráveis na produção animal desses bovinos leiteiros portadores de paratuberculose ou mastite, apresentando perdas econômicas significativas devido à redução da produção de leite e ao abate prematuro de animais infectados (Lee et al., 2024).

Tendo em vista as crescentes implicações econômicas da paratuberculose e a ausência de estudos que correlacionem MAP e células da glândula mamária, considerada a segunda vida de eliminação do agente, o estudo sobre o comprometimento apoptótico das células infectadas é essencial para o

esclarecimento da patofisiologia do agente. Logo, esses estudos, juntamente com coinfeções por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, principais agentes etiológicos da mastite bovina, poderão fornecer informações importantes para um novo entendimento na relação existente entre MAP e a glândula mamária.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos de apoptose e necrose das células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T), diante das interações entre MAP e bactérias causadores de mastite bovina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Realizar uma revisão de literatura de trabalhos sobre os mecanismos de evasão de MAP no sistema imune dos hospedeiros;
- (ii) Avaliar a viabilidade celular em células MAC-T infectadas por diferentes isolados de MAP (K10, ARG e RS) e co-infectadas por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli.*, em diferentes tempos (4, 12 e 24 horas), através de diferentes testes: determinação da Caspase 9, LDH (lactato desidrogenase) e mensuração da fluorescência de iodeto de propídio.
- (iii) Comparar o grau de apoptose e/ou necrose nas células MAC-T, infectadas com diferentes isolados de MAP, co-infectadas com *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*;
- (iv) Investigar a expressão gênica relacionada aos processos de apoptose e/ou necrose celular através da expressão dos genes Bax e Bcl2 pela técnica molecular de PCR em tempo real;

Capítulo I. Mecanismos e estratégias de evasão da resposta imune de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) em seus hospedeiros

Junnia Luísa Pena¹; David Germano Gonçalves Schwarz²; Abelardo Silva Júnior³; Maria Aparecida Scatamburlo Moreira^{1*}.

¹. Department of Veterinary– Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG – Brazil. junniluisa@hotmail.com; masm@ufv.br

². Department of Veterinary Medicine – Universidade do Estado de Santa Catarina – Santa Catarina – SC – Brazil. davidggs.vet@gmail.com
Brazil. davidggs.vet@gmail.com

³. Institute of Biological and Health Sciences – Universidade Federal de Alagoas – Maceió – AL – Brazil. asjvet@gmail.com

*Correspondence author: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira – e-mail: masm@ufv.br
Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Veterinária - Avenida Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa – Minas Gerais - 36570-900.

RESUMO

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da paratuberculose, também conhecida como doença de Johne, que acomete principalmente bovinos e pequenos ruminantes. Alguns estudos sugerem que MAP possa ter influência na doença de Cronh em humanos, devido às semelhanças na patogênese com a doença de Johne. Sabe-se que MAP pode invadir diferentes órgãos e interferir na resposta imune sistêmica. O mecanismo pelo qual MAP evade as células epiteliais ainda não está claramente descrito, desta forma o presente estudo objetivou realizar um levantamento sobre as vias, mecanismos de virulência e elementos que possam estar favorecendo a permanência de MAP de forma viável dentro de macrófagos, sem que sejam eliminados pelo sistema imune. As vias descritas e revisadas nesse trabalho referem-se a mecanismos de virulência e elementos que favorecem a permanência de MAP de forma viável nos hospedeiros, sobrevivendo dentro de macrófagos, sem que sejam eliminados pelo sistema imune. Desta forma, com entendimento desses mecanismos podemos mensurar possibilidades de evasão de MAP em células epiteliais, direcionando estudos que futuramente possam confirmar e melhor elucidar esses mecanismos, para melhor

compreensão da patofisiologia desse agente, e seus reais impactos na glândula mamária.

Palavras-chave: MAP; mecanismos de virulência; ruminantes; sistema imune.

1. Introdução

A infecção feco-oral por MAP é reconhecida como uma importante via de contaminação dentro do rebanho de ruminantes (Schwalm et al., 2019), principalmente em bezerros, pela ingestão de colostro, leite e contato com fezes de vacas contaminadas por MAP (Yamasaki et al., 2013). Essa suscetibilidade precoce à contaminação pode estar relacionada à capacidade limitada de animais jovens em controlar patógenos intracelulares, enquanto os bovinos adultos parecem ser refratários à infecção (Marino et al., 2017).

Segundo Khare et al., (2009), MAP apresentou um mecanismo de infecção eficaz para entrar em células epiteliais intestinais cerca de 30 minutos após o contato, favorecendo a disseminação. Após internalização, MAP pode ser encontrado no fagossomo de macrófagos, inibindo a sua acidificação e a fusão em fagolisossomo (Brumell et al., 2007) o que contribui para sua permanência e viabilidade (Lee et al., 2024).

A internalização de MAP no sistema linfático ocorre pelas células M (células microfold) e pelos enterócitos, penetrando na célula pelo lado apical e saindo da célula através da membrana baso lateral por transcitose (Cocito et al., 1994). A entrada de MAP nas células M depende da ligação entre fibronectinas (FN) e proteínas de ligação à fibronectina (FAPs) expressas pelo microrganismo, onde MAP FN-opsonizados se ligam a integrinas $\beta 1$ presentes na superfície luminal de células M (Byrd et al., 1993; Secott et al., 2004).

A presença de MAP parece estimular as proteínas Gdtas Cdc42 e RhoA que promovem o tráfego de MAP para o interior dos endossomas, onde se irá se acidificar, sendo um processo crucial para a rápida produção de IL-1 β , atraindo macrófagos subepiteliais e infectando-os de forma mais eficiente (Lamont et al., 2012; Bannantine e Bermúdez 2013).

Quando internalizado, MAP é fagocitado por macrófagos presentes na lâmina própria e submucosa intestinal (Abendaño et al., 2013). Os macrófagos servem

como nicho intracelular para a sobrevivência e multiplicação de MAP (Hussain et al., 2016), onde essas micobactérias podem residir intactas dentro da célula fagocítica, ou podem ser processadas e apresentadas aos linfócitos T (Vary et al., 1990; Lilenbaum et al., 2007).

Uma rápida resposta de acidificação do fagossoma pelo hospedeiro que permite a fusão fagossoma-lisossoma e a apresentação de antígenos às células T via MHC tipo I são causas de morte bacteriana. A sobrevivência de MAP pode ocorrer na ausência dessa fusão, uma vez que fagossomas portadores de MAP deixam de adquirir quantidades significativas de proteína de membrana associada ao lisossoma (LAMP-1), não se fundindo aos lisossomas, garantido assim a sua proliferação dentro dos macrófagos (Abendaño, et al., 2013).

Como uma tentativa de impedir a multiplicação intracelular de MAP, os macrófagos liberam fatores solúveis que recrutam novas células inflamatórias para o local (Yamasaki et al., 2013), onde o efeito da invasão tecidual causada por MAP e a multiplicação dos macrófagos formam granulomas nos segmentos mediano e distal do intestino (Tiwari et al., 2006; Coussens et al., 2010).

Assim, ocorre o desenvolvimento de uma enterite granulomatosa, uma evidência característica da doença, podendo ser acompanhada de sinais clínicos como de perda de peso progressiva, diarreia crônica, desidratação, podendo ocasionar em morte (Lombard et al., 2005; Mckenna et al., 2006; Smith et al., 2009; Kudahl e Nielsen, 2009; Marino et al., 2017; Sallam et al., 2018).

Considerando que MAP pode invadir diferentes órgãos e interferir na resposta imune sistêmica, o entendimento dos mecanismos e elementos podem elucidar possibilidades de evasão de MAP em células epiteliais, que implicam em processos de morte celular ou preservação da célula infectada por esse agente, direcionando estudos que futuramente possam melhor compreender esses mecanismos, e seus reais impactos na glândula mamária.

2. Resposta Imune do Hospedeiro infectado por MAP

A paratuberculose é caracterizada por um período prolongado de infecção subclínica assintomática sendo considerada uma doença dinâmica que apresenta oscilações entre imunidade celular ou resposta humoral (Yamasaki, et al., 2013), com períodos de remissão e exacerbação da atividade imunológica, durante o curso

da infecção. Aparentemente o hospedeiro demonstra controlar a doença, impedindo a replicação bacteriana dentro dos macrófagos, sendo este um mecanismo imune do hospedeiro mediado por Th1 (T-helper1) (Stabel et al., 2019).

A eficácia da resposta imune Th1 ocorre comumente em infecções intracelulares causadas por micobactérias não patogênicas. Como MAP possui estratégias de sobrevivência dentro de macrófagos infectados, o hospedeiro não consegue eliminar a infecção (Ariel, et al., 2020). À medida que a infecção se agrava, é observado predominantemente uma resposta imune tipo Th2 (T-helper2), deixando de ser uma doença subclínica (Hussain et al., 2016), sendo este um evento imune característico da paratuberculose.

Citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-13, IL-4, IL-10, e TGF- β , são produzidas pelas células B, que podem assumir funções efetoras e regulatórias no hospedeiro (Lund, 2008). Segundo Stabel et al., (2019) uma maior presença de células B e uma resposta aumentada ao antígeno podem explicar os níveis expressivos de citocinas secretadas observados em bovinos com paratuberculose subclínica e clínica.

Macrófagos ativados produzirão interleucina-1 (IL-1), que junto aos eventos de apresentação do antígeno através das moléculas MHC II e MHC I irão ativar populações de linfócitos T (CD4 + e CD8 +, respectivamente), que por sua vez produzirão IL-2, resultando em uma expansão clonal específica dessas duas populações de células (Vary et al., 1990). A interleucina 6 (IL-6) também desempenha um papel na condução de células TCD4 para um fenótipo Th2 e altos níveis de anticorpos séricos para MAP em animais na fase clínica da paratuberculose, fornecendo evidências de uma resposta imune Th2 (Stabel, et al., 2019), com a progressão da doença os animais terão capacidade de gerar respostas imunes mediadas por Th2, bem como manter a capacidade de aumentar a imunidade mediada por Th1.

Além das interleucinas descritas anteriormente, observa-se na paratuberculose uma produção predominantemente aumentada e precoce de interferon-gama (IFN- γ), permanecendo por um longo período durante a infecção (Hussain et al., 2016). O IFN- γ é responsável pelo controle e eliminação de agentes intracelulares devido à ligação de células alvo e receptores de IFN de alta afinidade, que ativam a via JAK-STAT (Janus quinase / transdutores de sinal e ativadores de transcrição) (Bach et al., 1997).

Em um estudo realizado por Stabel et al., (2019,) foi relatado que as respostas de IFN- γ específicas do antígeno foram semelhantes em bovinos com paratuberculose clínica e subclínica, que apresentavam níveis de anticorpos séricos mais elevado para doença clínica.

Além da ativação de células TCD4+ e TCD8+, Roussey et al., (2016), sugerem a existência de um subtipo de células T reguladoras (Treg), estejam desempenhando uma regulação na paratuberculose bovina, através de interações entre células Treg e células T herper tipo 17 (Th 17), que produzem IL-17. Lockhart et al., (2006) demonstraram em seus estudos que a fonte primária de IL-17 são as células T $\gamma\delta$, ao invés das células TCD4, em resposta à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

Segundo Stabel et al., (2019) bovinos com apresentação clínica da paratuberculose apresentaram número reduzido de células T $\gamma\delta$ TCR+, e redução da secreção de IL-17 pelas células em cultura. Além disso, a progressão da doença pode causar a hiporresponsividade das células T, relatada como anergia ou exaustão das células T (Ariel, et al., 2020). Esses mecanismos reguladores de populações de células T sugerem o favorecimento da permanência de MAP e suas implicações nos processos infectivos.

O papel regulador de IL-10 pode inibir a função dos macrófagos, permitindo a replicação intracelular de MAP (Hussain et al., 2016). A superexpressão de IL-10 pode ser responsável pela redução associada a MAP na expressão do gene TNF- α pró-apoptótico observado em macrófagos bovinos e humanos (Abendaño et al., 2013). As respostas inflamatórias mediadas por IL-10 são mais críticas em animais que apresentam respostas inflamatórias crônicas aos patógenos, a exemplo de animais que estejam na fase clínica da paratuberculose (Iyer et al., 2012). Stabel, et al., (2019) observaram em seus estudos que o nível de IL-10 foi mais elevado em animais na fase clínica, indicando que uma resposta imune regulatória estava ocorrendo.

As citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-18 estão envolvidas em papéis críticos na indução de IFN- γ em infecções por micobactérias (Mendez-Sampiero et al., 2010). Aumentos nos níveis de IL-12 e IL-18 foram observados em bovinos infectados por MAP, sugerindo uma forte resposta imune mediada por Th1 em animais com a manifestação clínica da paratuberculose (Stabel, et al., 2019). Em um estudo realizado por Kleinwort et al., (2019), os autores sugerem que a secreção de

IL-12 indica uma resposta imune protetora contra a infecção por MAP em linfócitos do sangue periférico, reconhecendo que é necessária uma investigação mais aprofundada sobre o papel da IL-12 na infecção de MAP.

3. Mecanismos de evasão da resposta imune de MAP nos hospedeiros

O mecanismo pelo qual MAP evade as células epiteliais ainda não está claramente evidenciado, mas algumas vias, mecanismos de virulência e elementos que favorecem a permanência de MAP de forma viável, sobrevivendo dentro de macrófagos, sem que sejam eliminados pelo sistema imune são descritos.

Após a ligação aos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), MAP desencadeia vias de sinalização das células fagocíticas, bem como a ativação da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), sendo uma estratégia de sobrevivência para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Fratti et al., 2003). MAP utiliza as vias de sinalização de receptores toll-like (TLR), com intuito de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Ariel et al., 2020). Assim como observado na infecção causada por *M. tuberculosis* (Johansson et al., 2015), após o reconhecimento do TLR2, MAP ativa o MAPK-p38, inibindo a maturação e acidificação dos fagossomos (Hussain et al., 2016) garantindo sua persistência dentro dos macrófagos.

MAPK-p38 desempenha um importante papel na supressão da resposta antimicrobiana em macrófagos (Weiss et al., 2008), realizando a indução da produção de uma citocina anti-inflamatória, IL-10, e assim MAPK-p38 e IL-10 agem para suprimir a resposta antimicrobiana e resposta imune, levando à persistência de MAP dentro de macrófagos (Souza et al., 2006; Bannantine et al., 2015). Segundo relato em Hussain et al., (2016), o reconhecimento do antígeno via TLR2 / 4 e CD14 in vitro e in vivo leva à secreção excessiva de IL-10 ao interromper as respostas inflamatórias e a geração de imunidade adotiva, proporcionando assim um nicho para a sobrevivência persistente de MAP.

A resposta anti-inflamatória de IL-10 é mediada por receptores de IL-10 ligados à membrana, levando à trans-fosforilação e ativação Janus Kinase (JAK) associadas ao receptor da família tirosina quinases (TyKs), que promove a ativação de fatores da transcrição latente, transdutor de sinal e ativadores da transcrição 3 (STAT3) (Hussain et al., 2016).

Uma produção aumentada e precoce de IFN- γ em animais com paratuberculose é responsável pelo controle e eliminação de agentes intracelulares devido à ativação da via JAK-STAT (Janus quinase / transdutores de sinal e ativadores de transcrição) (Bach et al., 1997). Observa-se que IFN- γ permanece por um longo período durante a infecção (Hussain et al., 2016), sugerindo a susceptibilidade de MAP. Desta forma, considera-se IFN- γ como uma citocina que demonstra importância no controle da infecção micobacteriana (Hostetter et al., 2003). Alguns estudos realizaram a adição de IFN- γ em culturas de macrófagos infectados com MAP e observaram que a citocina não parece promover a morte da bactéria (Zhao et al., 1997; Simutis et al., 2007; Bannantine et al., 2015). Segundo Abdissa et al., (2020), a presença de MAP estimula a produção de IFN- γ , podendo apresentar mecanismos ainda não elucidados, onde esta citocina parece não interferir na viabilidade de MAP enquanto dentro dos macrófagos.

Outro mecanismo pelo qual MAP sobrevive dentro dos macrófagos é pela inibição da acidificação e da maturação do fagossoma. Segundo descrito Bannantine et al., (2015) marcadores lisossomais não se acumulam em fagossomas contendo MAP, e também não se acidificam abaixo de pH=6,3 em macrófagos, indicando uma falha do fagossomo em amadurecer em um fagolisossomo. Segundo Abdissa et al., (2020), uma forte resposta de células T e atividade concomitante de óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS₂) e óxido nítrico (NO) parecem controlar a infecção de MAP, mas ao mesmo tempo permite o desenvolvimento de cronicidade e persistência do patógeno.

Após a ingestão por animais suscetíveis, MAP atinge o intestino onde o epitélio intestinal serve como a primeira barreira defensiva contra o microrganismo, principalmente por mecanismos inatos como glicocálix, junções celulares e peptídeos antimicrobianos (Bannantine e Bermúdez 2013). A presença dos lipídios associados aos patógenos e ao hospedeiro tem sido descrita como uma estratégia para a sobrevivência e persistência de MAP (Ariel et al., 2020).

MAP apresenta componentes na parede celular e lipopolissacarídeos que diminuem os mecanismos de defesa dos macrófagos, permitindo que se multiplique dentro dos macrófagos e assim desencadeando a doença. A presença de lipoarabinomanano (LAM), na parede celular é responsável pela inativação de macrófagos, considerado um fator de virulência (Lilenbaum et al., 2007). Lipoarabinomanano manossilado (Man-LAM) é um lipoglicano de parede celular de

micobactérias patogênicas, incluindo MAP, capaz de se ligar a TLR2 e ativar a sinalização intracelular da via MAPK-p38. A ativação dessa via resulta na produção de IL-10 responsável por suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, IL-12 e fator de histocompatibilidade tipo II (Arsenault et al., 2014).

Segundo Souza et al., (2013), os Man-LAM derivado de MAP de macrófagos bovinos, induziu uma expressão rápida e prolongada da mensagem de IL-10, bem como expressão transitória de TNF- α , podendo interagir com os receptores de manose nos macrófagos para promover a produção de IL-10 e inibir a acidificação do fagossoma. Talvez esses sejam fatores de virulência que facilitam a sobrevivência de MAP em macrófagos.

4. Conclusão

As vias descritas nesse trabalho de revisão de literatura foram as vias de sinalização por TLR, inibição da acidificação e maturação de fagossomos, proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), interferon-gama (IFN- γ), óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS2), interleucina 10 (IL-10) e lipoarabinomanano manossilado (Man-Lan), que se referem a mecanismos de virulência e elementos que favorecem a permanência de MAP de forma viável nos hospedeiros, sobrevivendo dentro de macrófagos, sem que sejam eliminados pelo sistema imune.

O entendimento desses mecanismos podemos mensurar possibilidades de evasão de MAP em células epiteliais, direcionando estudos que futuramente possam confirmar e melhor elucidar esses mecanismos, para melhor compreensão da patofisiologia desse agente, e seus reais impactos na glândula mamária, principalmente quando relacionados a viabilidade celular.

5. Referências Bibliográficas

- Abdissa, K., et al., (2020). Relevance of inducible nitric oxide synthase for immune control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in mice. **Virulence**, 11(1), 465–481.
- Abendaño, N., et al., (2013). Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **BioMed research international**, 2013, 908348.
- Ariel, O., et al., (2020). Transcriptome Profiling of Bovine Macrophages Infected by *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* Depicts Foam Cell and Innate Immune Tolerance Phenotypes. **Frontiers in immunology**, 10, 2874.
- Arsenault, R. J., et al., (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Vet. Res.** 45, 54.
- Bach, E. A., et al., (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annu Rev Immunol**, 15:563–591, 1997.
- Bannantine, J. P.; Bermudez, L.E. (2013). No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Infect Immun** 81:3960–3965.
- Bannantine, J. P., et al., (2015). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* recombinant proteins modulate antimycobacterial functions of bovine macrophages. **PLoS One** 10:e0128966.
- Brumell, J. H., & Scidmore, M. A. (2007). Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 71(4), 636-652.
- Byrd, S. R.; et al., (1993). Roles of soluble fibronectin and beta 1 integrin receptors in the binding of *Mycobacterium leprae* to nasal epithelial cells. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.69, p.266-271.
- Cocito, C.; et al., (1994). Paratuberculosis. **Clin. Microbiol.**, 7, 328-345.
- Coussens, P. M.; et al., (2010). Host pathogen interactions and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Berhs M.A. & Collins D.M. (Eds), Paratuberculosis: Organism, disease, control. **CAB International**, Cambridge. 375p.
- Fratti, R.A., Chua J., Deretic V. (2003). Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1(EEA1) recruitment to phagosomal membranes. **J Biol Chem**. 2003;278:46961–7

Hostetter J., et al., (2003) "Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells," *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 26, no. 4, pp. 269–283.

Hussain, T., et al., (2016). The role of IL-10 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Cell communication and signaling* : CCS, 14(1), 29

Khare, S., et al., (2009). Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary pathology*, 46(4), 717-728.

Kleinwort, K., et al., (2019). Peripheral blood bovine lymphocytes and MAP show distinctly different proteome changes and immune pathways in host-pathogen interaction. *PeerJ*, 7, e8130.

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

Lamont, E. A.; et al., (2012). Infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* results in rapid interleukin-1beta release and macrophage transepithelial migration. *Infect. Immun.* 80:3225–3235.

Lee, J. J., et al., (2024). Proteomic profiling of membrane vesicles from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Navigating towards an in silico design of a multi-epitope vaccine targeting membrane vesicle proteins. *Journal of Proteomics*, 292, 105058.

Lilenbaum, W.; et al., (2007). Paratuberculosis: an update. *J. Microbiol.*, São Paulo , v. 38, n. 4, p. 580-590.

Lockhart, E., et al., (2006). IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 177(7), 4662–4669.

Lombard, J. E.; et al., (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 227, p.1975–1981.

Lund, F. E., (2008). Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 332-338.

Marino, R., et al., (2017). Johne's disease in cattle: an in vitro model to study early response to infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using RNA-seq. *Molecular immunology*, 91, 259-271.

Mendez-Sampiero , P. (2010). Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. *Int J Infect Dis* 14:e366–e371.

Mckenna, S. L.; et al., (2006) Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, p.1089–1099.

Rossi, G., et al., (2017). The effect of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. **Journal of dairy science**, 100(9), 7446-7454.

Roussey, J. A., et al., (2016). Regulatory T cells and immune profiling in Johne's disease lesions. **Vet Immunol Immunopathol**.181:39–50.

Sabat, R. (2010). IL-10 family of cytokines. **Cytokine & growth factor reviews**, 21(5), 315-324

Sallam, A. M.; et al., (2018). A positional candidate gene association analysis of susceptibility to paratuberculosis on bovine chromosome 7. **Infection, Genetics and Evolution**, 65, 163-169, 2018.

Schwalm, A. K., et al., (2019). Field study on bovine paratuberculosis using real-time PCR and liquid culture for testing environmental and individual fecal samples implemented in dairy cow management. **J Dairy Sci**;102(12):11260-11267

Secott, T.E.; et al., (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-Cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. **Infection and immunity**, v.72, n.72, p.3724-3732.

Simutis, F. J.; et al., (2007) Failure of antigen-stimulated gammadelta T cells and CD4+ T cells from sensitized cattle to upregulate nitric oxide and mycobactericidal activity of autologous *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected macrophages. **Vet Immunol Immunopathol** 116: 1–12.

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

Smith, R. L.; et al., (2009). A longitudinal study on the impact of Johne's disease status on milk production in individual cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 2653–2661.

Souza, C. D., et al., (2006). Mitogen activated protein kinase p38 pathway is an important component of the antiinflammatory response in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*- infected bovine monocytes. **Microb. Pathog**. 41:59–66.

Souza, C., et al., (2013). Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* organisms. **PloS one**, 8(9), e75924.

Stabel, J. R. (2010). Immunology of Paratuberculosis. Infection and Disease. In: Berhs M.A. & Collins D.M. (Eds), Paratuberculosis: Organism, disease, control. **CABI.org**, Cambridge. 375p.

Stabel, J. R., & Bannantine, J. P. (2019). Divergent Antigen-Specific Cellular Immune Responses during Asymptomatic Subclinical and Clinical States of Disease in Cows Naturally Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Infection and immunity**, 88(1), e00650-19.

Tiwari A.; et al., (2006). Johne's disease in Canada. Part I. Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. **Can. Vet. J.** 47:874-882.

Vary, P.H.; et al., (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. **J. Clin. Microbiol.**, 28, 933-937.

Weiss, D. J., C. D., et al., (2008). Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. **J. Leukoc. Biol.** 83:48–55.

Yamasaki, E. M.; et al., (2013). Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33 (2), 127-140.

Zhao, B., et al., (1997) Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. **Infect Immun** 65: 1761–1766.

Capítulo II. Comprometimento apoptótico e necrótico em células MAC-T infectadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) e co-infectadas por bactérias causadoras de mastite bovina

Junnia Luísa Pena¹; Leandro Licursi de Oliveira²; Arthur Willian de Lima Brasil³; Karina Silva Funabashi⁴; David Germano Gonçalves Schwarz⁵; Yung-Fu Chang⁶; Fernando Alberto Paolicchi⁷; Maria Aparecida Scatamburlo Moreira^{1*}.

1. Department of Veterinary– Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG – Brazil.

junnialuisa@hotmail.com; masm@ufv.br

2. Department of General Biology– Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG – Brazil.

leandro.licursi@ufv.br

3. Department of morphology – Universidade Federal da Paraíba – Campus I Centro de Ciências da Saúde – João Pessoa – PA – Brazil. arthurwillian7@yahoo.com.br

4. QIAGEN – São Paulo – SP – Brazil. ksfunabashi@gmail.com

5. Department of Veterinary Medicine – Universidade do Estado de Santa Catarina – Santa Catarina – SC – Brazil. davidggs.vet@gmail.com

6. Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences Cornell University - College of Veterinary Medicine - Ithaca, NY 14853.

7. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) and Universidade Nacional de Mar del Plata – Argentina

*Correspondence author: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira – e-mail: masm@ufv.br

Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Veterinária - Avenida Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Viçosa – Minas Gerais - 36570-900.

RESUMO

Considerando que MAP favorece a internalização e permanência dos agentes causadores da mastite na glândula mamária, suspeita-se de interações ainda não compreendidas que possam intensificar os processos inflamatórios e agravar ainda mais o quadro dos animais acometidos. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a viabilidade das células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T) “in vitro”, diante das interações entre MAP e bactérias causadoras de mastite bovina. Para conferir a viabilidade celular e indicativos de morte celular nas células MAC-T infectadas por diferentes isolados de MAP e co-infectadas separadamente por bactérias causadoras de mastite bovina, foram realizados os ensaios de Caspase 9,

LDH, iodeto de propídio, e ensaios moleculares conferindo a expressão dos genes Bax e Bcl2 por qPCR em amostras submetidas a três tempos distintos, 4, 12 e 24 horas, realizadas em duas repetições biológicas. Foi possível observar maior liberação de caspase 9 em amostras de MAP-RS co-infectado por *S. agalactiae* no tempo 24 horas. Os ensaios de LDH demonstram ausência de necrose células nas amostras analisadas. As amostras dos ensaios de infecção por MAP-K10 e MAP-ARG em células MAC-T demonstraram resultados significativos e uma maior marcação de iodeto de propídio, sendo mais evidente quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 no tempo de 24 horas. A expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 foi observada significativamente nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada por MAP-ARG co-infectado por *E. coli*. Quanto ao gene pró-apoptótico Bax foi observada a expressão significativa nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada também por MAP-K10 porém co-infectado por *S. agalactiae*. Conclui-se que quando infectadas por MAP e co-infectadas por bactérias causadoras de mastite bovina, as células MAC-T tiveram uma redução considerável em sua viabilidade celular.

Palavras-chave: apoptose; co-infecção; morte celular; necrose; paratuberculose bovina.

1. INTRODUÇÃO

A presença de patógenos na glândula mamária pode afetar a resposta imune do hospedeiro à infecção, induzindo a morte celular por apoptose e causando a destruição do tecido (DeLeo, 2004). A ocorrência dos processos de apoptose e necrose celular pode ocorrer pela via extrínseca ou pela via intrínseca (Del Re et al., 2019). Ambas as vias se encontram na etapa final de ativação da caspase e comumente levam à clivagem de diferentes proteínas, após a ativação de moléculas intermediárias distintas, pela cascata de sinalização (Kiraz et al., 2016).

Ambas as vias, extrínseca ou intrínseca acarretam na ativação de proteases da caspase e na clivagem de proteínas intracelulares, levando à destruição da

célula, sendo representadas pelas caspase-8 e caspase-9, descritas como caspases apicais da cascata de sinalização apoptótica (Green et al., 2015).

A via extrínseca envolve os receptores de morte presentes na superfície celular, como a proteína Fas, o receptor de fator de necrose tumoral - TNFR1 ou receptor do ligante indutor de apoptose relacionado ao receptor de necrose tumoral - TRAIL-R, que induzem a apoptose ao recrutar diretamente uma plataforma de ativação de caspase mediante a ligação (Kiraz et al., 2016). Fas, um receptor de morte localizado na superfície de várias células, interage com seu ligante FasL, que ativa a caspase-8 (Yamada et al., 2017).

Já a via intrínseca, através de estímulos de estresse ocorridos na mitocôndria (Ramirez e Salvesen, 2018), causam permeabilização da membrana mitocondrial externa pela presença de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl2, que liberam citocromo c para o citosol (Green, et al., 2015). A resposta mitocondrial aos sinais apoptóticos é regulada pelas proteínas da família do linfoma de células B-2 (Bcl-2), que incluem membros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-W) e membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bim).

Proteínas pró-apoptóticas (Bax), e proteínas apoptóticas (Bcl2), podem alterar à permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), desencadeando indução de apoptose pela via intrínseca podendo causar a difusão de numerosas proteínas para o citosol que normalmente residem no espaço entre as membranas mitocondriais externa (OMM) e interna (IMM) (Dewson, et al., 2009; Tait et al., 2010).

Membros pró-apoptóticos como Bax, controlam a liberação de citocromo c, (CytoC) das mitocôndrias para o citoplasma regulando o poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Desta forma, o citocromo C recruta e ativa a caspase-9 através do APAF1 (Del Re et al., 2019), e em seguida caspase-8 e caspase-9 podem ativar a caspase-3, que induz a apoptose (D'Arcy, 2019).

Infecções por micobactérias podem desencadear modalidades de morte celular, programadas ou não (Mohareer et al., 2018), que serão mediadas e classificadas a depender do tipo de interação que ocorrerá entre o hospedeiro e o patógeno (Nandi e Behar, 2011). Dentre elas, a apoptose é um dos mecanismos regulados de morte celular mais estudado em infecções por *Mycobacterium* spp. (Molloy et al., 1994, Fratazzi et al., 1997, Derrick e Morris, 2007, Ramon-Luing et al., 2022).

Assim como múltiplos isolados de MAP podem infectar o mesmo animal e sofrer alterações adicionais dentro do hospedeiro, aumentando a diversidade fenotípica para superar as respostas do hospedeiro (Byrne et al., 2023), as mesmas contribuições podem estar associadas à presença de patógenos causadores de mastite bovina, como *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*.

Considerando os impactos que a paratuberculose e a mastite podem ocasionar na produção e sanidade dos animais afetados, bem como pela ausência de estudos que correlacionem MAP e as células da glândula mamária, torna-se relevante a realização de estudos a fim de verificar os danos celulares que os processos inflamatórios gerados por MAP e bactérias da mastite bovina podem causar em células MAC-T comprometendo a sua viabilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Doenças Bacterianas (LDBAC), Laboratório de Virologia Animal (LVA), localizados no Departamento de Veterinária, no Laboratório Imunoquímica e Glicobiologia (LIG), localizado no Departamento de Biologia Geral, e no Laboratório de Biologia Molecular (BIOMOL) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

2.1. Isolados bacterianos e condições de cultura

Foram utilizados três isolados de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP): K-10 um isolado padrão, ARG - isolado na Argentina e RS - isolado no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, todos de bovinos e pertencentes à bacterioteca do LDBAC. Também foram utilizados os isolados *Staphylococcus aureus* (SA33), *Streptococcus agalactiae* (SA3930), e *Escherichia coli* (13-30), obtidos de leite bovino com mastite cedidos pela Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora – MG.

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

Os isolados de MAP foram cultivadas em caldo de Middlebrook (MB) 7H9 contendo 0,2% de glicerol, 10% de suplemento de crescimento OADC (Oliec Albumin Dextrose Catalase) e micobactina J (2 mg/L) (Allied Monitor, Inc. Fayette, MO), a 37 °C em estufa sob agitação por aproximadamente seis semanas até atingir a densidade óptica [OD₆₀₀] = 0.5, equivalente a 10⁶ UFC/mL, conforme padronizado por Schwarz, 2016. A pureza, confirmação e identificação foi certificada por meio de cultivo microbiológico em ágar MB, coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, e ensaios moleculares pelas técnicas de PCR - padrão do IS900 e Kit bactotype MAP PCR - Qiagen.

2.1.2 Cultivo de bactérias de mastite bovina

Os isolados de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram reativados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) em estufa por 24 horas a 37 °C, e posteriormente foi realizado um plaqueamento de superfície com 100 uL do cultivo bacteriano procedendo o espalhamento com alça de Drigalski em ágar BHI por 24 horas a 37 °C. Colônias típicas foram selecionadas e transferidas para outras placas contendo ágar BHI por esgotamento através de estrias compostas, sendo novamente incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C. Desta forma obteve-se a pureza das colônias sendo comprovadas pela coloração de gram e catalase.

Colônias *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* puras foram cultivadas em caldo BHI *overnight* em estufa a 37 °C, sendo 5 mL transferidos para tubos de 50 mL de caldo BHI estéril, e posteriormente incubados em estufa com agitação de 200 rpm, até atingir densidade óptica a [OD₆₀₀] = 0.1 equivalente a 10⁶ UFC/mL, previamente padronizado. Desta forma foram aferidos os valores de crescimento bacteriano entre 0,1 a 1,0, constatando o crescimento, por plaqueamento em ágar BHI por 48 horas a 37 °C, realizados em duplicata e repetidos por três vezes.

2.2. Cultivo de células epiteliais da glândula mamária (MAC-T)

As células MAC-T foram cultivadas em frascos de cultura celular T25 (TPP Techno Plastic, St. Louis, MO, EUA) a 37 ° C com 5% de CO₂, contendo Meio de

Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) e 1% de penicilina / estreptomicina (100 µg/ml) até a confluência das células.

Depois de visualizar a monocamada no microscópio de contraste de fase Nikon (Nippon Kogaku KK, Tóquio, Japão), as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7.2), ressuspensas em tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo o protocolo do LVA, e posteriormente utilizadas nos experimentos.

2.3. Ensaio de internalização bacteriana

O ensaio de internalização foi realizado seguindo o procedimento descrito por Bouchard et al., 2013. As monocamadas confluentes de células MAC-T foram preparadas como descrito acima, lavadas duas vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente, ressuspensas com tripsina a 0,25% durante 5 minutos e coradas com 0,4% de azul de tripano (Invitrogen) para contagem de células viáveis em câmara de hemocitômetro.

As células MAC-T foram distribuídas (3×10^5 células) em placas de poliestireno de 24 poços em meio de cultura celular (DMEM, FBS a 10%, sem antibióticos) e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 h.

Após 90-95% de confluência das monocamadas, as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente e infectadas previamente com MAP ($1,0 \times 10^6$ UFC) durante 2 horas, posteriormente co-infectadas com *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae* ($1,9 \times 10^6$ UFC/mL, $1,8 \times 10^6$ UFC/mL e $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente), separadamente. Antes da co-infecção foi adicionado aos poços amicacina com a finalidade de garantir a ausência de MAP fora do cultivo celular. Os ensaios de co-infecção aconteceram durante 4 horas, 12 horas e 24 horas, sendo as placas com as amostras incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Subsequentemente, os sobrenadantes de cultura foram armazenados em ultra freezer a - 80 °C e as monocamadas foram lavadas quatro vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente e lisadas com 50 µL de tripsina 0,25% (p / v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e Triton X-100 a 0,1% (vol / vol) (Amersham, Arlington

Heights, IL) diluídos em PBS (pH 7.2) durante 10 minutos. Os lisados também foram armazenados em ultra freezer a - 80 °C.

2.4. Detecção de apoptose celular

Para a mensuração indireta da expressão gênica relacionada à morte celular de células MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, foi realizada a detecção de Caspase 9 pelo Kit Human Caspase 9 ELISA (Invitrogen). Os ensaios foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

Para avaliar a morte celular em células MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, foram adicionados 10 µl de “Propidium iodide solution” - 5mg/ml (Sigma-Aldrich) em cada poço da placa cultivo celular. Após incubação por 15 minutos a 37°C em estufa de CO₂, os poços foram lavados com PBS por três vezes e lisados com 200 µL de Triton-X 1%, sendo transferidos 150 µL dos lisados para placa de 96 poços para quantificação da absorbância em leitor de microplacas SpectraMax® M5 a 450nm.

2.5. Detecção de necrose celular

Para verificar a viabilidade das células MAC-T durante os diferentes tempos de infecção por MAP co-infectado separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, foi verificada a liberação de lactato desidrogenase (LDH).

Para o teste, 5 µL do sobrenadante foram transferidos para placas de poliestireno de 96 poços. A seguir, foram adicionados 200 µL da mistura de reação do kit de detecção de LDH, seguindo as recomendações do fabricante (Bioclin - REF: K014, Brasil).

A placa foi então incubada por 5 minutos a 37°C, e a absorbância quantificada em um espectrofotômetro de microplaca Thermo Scientific - Multiskan GO a 340 nm. Para o controle da morte celular foi utilizado a inoculação Triton X-100 0,1% (vol / vol) nas células, e para o controle da viabilidade celular, apenas as células MAC-T sem nenhuma inoculação. Este teste foi realizado em duplicata com duas repetições biológicas.

2.6. Ensaios Moleculares

As amostras obtidas dos ensaios de internalização bacteriana foram primeiramente centrifugadas a 12.000 xg durante 5 min e lavadas duas vezes com PBS (pH 7.2) em temperatura ambiente. Para a extração de DNA, o kit DNeasy UltraClean Microbial (Qiagen) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas pelo DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen) foram quantificadas em nanodrop. As qPCRs foram realizadas através do kit “*bactotype* MAP PCR (Qiagen)”, seguindo as recomendações do fabricante, com intuito de confirmar a presença de MAP no interior das células MAC-T.

Para a extração de RNA, o RNeasy Mini (Qiagen) foi utilizado, seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração de RNA foram determinadas medindo a razão 260/280 em um espectrofotômetro NanoDrop.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit QuantiNova SYBR Green (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi obtida uma concentração final de 400ng de cDNA num total de 20 µL.

Os padrões pró-apoptóticos, expressão do gene Bax e anti-apoptóticos, expressão do gene Bcl2, foram analisados por qPCR como descrito abaixo.

Resumidamente, mRNAs totais isolados de células MAC-T infectadas por MAP MAP e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, em diferentes tempos, foram extraídos pelo Kit RNeasy Mini (Qiagen) e foram utilizados para sintetizar cDNA usando o kit de transcrição reversa QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Os cDNAs foram amplificados em qPCR em tempo real para os genes Bax e Bcl2 usando o Kit QuantiNova SYBR Green (Qiagen).

Para o gene Bax foram utilizadas as seguintes sequências iniciadoras (forward: 5'-CGA GTT GAT CAG GAC CAT CAT-3' e reverse: 5'-ATG TGG GTG TCC CAA AGT AG-3 ') e para o gene Bcl2 (forward: 5'-GAT TTC TCC TGG CTG TCT CTG-3' e reverse: 5'-GCC TGT GGG CTT CAC TTA T-3). Os padrões de expressão destes genes foram comparados com β -actina (forward: 5'-GGC GCT TGA CTC AGG ATT TA- 3 ' e reverse: 5'-CGG CCA CAC TGT AGA ACT TT-3').

2.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk $P > 0,05$, e como todas as amostras apresentaram distribuição normal os dados foram submetidos a anova fatorial com comparação par a par entre tratamentos e tempos pelo teste de Bonferroni. Os dados foram analisados no SPSS 24 ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas ao nível de significância de 5% no aplicativo SPSS 20.

Para os ensaios moleculares foi realizada a análise de correlação dos dados com o auxílio do programa Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), sendo feitas comparações entre as amostras dos ensaios de internalização bacteriana mediante a expressão gênica de Bax e Bcl2, pela técnica de PCR tempo real.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção da Caspase 9 foi realizada com intuito de detectar a morte celular das células MAC-T infectadas por distintos isolados de MAP, co-infectadas separadamente por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*, em tempos diferentes. A presença de Caspase 9 nas amostras analisadas é indicativo de morte celular por apoptose, pois essas enzimas são capazes de degradar os componentes da matriz nuclear e do citoesqueleto (Bouzon et al., 2010).

Foi possível observar diferença estatística nas amostras de MAC-T infectadas por MAP-RS e co-infectadas com *S. agalactiae*, apresentando uma maior expressão de caspase 9 no tempo 24 horas. Houve diferença significativa no tempo 4 h para 24 h, bem como do tempo 12 h para 24 h, demonstrando quanto maior o tempo de infecção maior liberação de caspase 9, conforme já era esperado. (Tabela 1). No tempo 24 horas houve também diferença estatística entre MAP-RS co-infectado por *S. agalactiae* comparado aos demais tratamentos nesse mesmo tempo (Figura 1), porém infectadas por cepas de MAP-K10 ou MAP-ARG, e co-infectadas por *S. aureus*, *S. agalactiae* ou *E. coli*.

Podemos influir que quanto mais tempo de duração dos processos de infecção e co-infecção, mais haverá a morte celular por apoptose. A apoptose pode ser desencadeada por fatores causadores de estresse celular ou através de

receptores de morte (Thornberry e Lazebnik, 1998), onde as caspases atuam como iniciadoras, sendo representadas pelas caspases 2, 8, 9 e 10, que por sua vez clivam as formas inativas das caspases efetoras, representadas pelas caspases 3, 6 e 7 (Kook et al., 2019). As caspases apoptóticas iniciadoras também são reconhecidas como apicais (Betsaida et al., 2023) e possui a caspase 9 como uma importante representante desse grupo, que uma vez ativada, cliva e ativa a caspase-3 e a caspase-7 para iniciar a cascata apoptótica (Riedl e Salvesen, 2007).

Para que ocorra a cascata apoptótica é necessário então que a caspase 9 seja ativada, processo esse que ocorrerá durante a execução da via extrínseca, onde a caspase-8 cliva o BID, resultando em cBID, proteína presente no citosol, que irá promover a liberação do citocromo c mitocondrial, a montagem do apoptossomo e a posteriormente ativação da caspase-9 (Tait e Green, 2010). A expressão da caspase 9 nas amostras analisadas demonstra a ocorrência da cascata apoptótica em células MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas por bactérias causadoras da mastite bovina.

Segundo os estudos realizados por Alam et al., (1999), a ativação de caspases trata-se de uma resposta fisiológica ao desencadeamento do receptor de células T (TCR) e está envolvida nas etapas iniciais que levam à proliferação de linfócitos. Para que haja um equilíbrio e se mantenha a homeostase, a apoptose de células T efetoras ocorre após rápida expansão desse repertório celular que se desenvolvem em resposta à infecção por micobactérias. Desta forma, são eliminadas as células T efetoras que por ventura apresentar um potencial patogênico (De Matteis et al., 2023).

As amostras de MAP-RS co-infectadas por *S. agalactiae* apresentaram morte celular nas primeiras horas de infecção (4 horas), aumentando progressivamente até o final da experimentação (24 horas). A não discrepância da quantificação de caspase 9 dentre as demais amostras analisadas caracterizaram ausência de significado estatístico, mas demonstram significado biológico, mostrando que processos apoptóticos ocorrem, mesmo em quantidades não significativas. Essa característica é observadas em patógenos intracelulares como as micobactérias, que podem induzir a ativação de mecanismos apoptóticos menos intensos em comparação com cepas avirulentas ou atenuadas, confirmando as estratégias que esses patógenos desenvolvem para bloquear a apoptose e assim garantir a sobrevivência das células hospedeiras (Keane et al., 2000).

Desta forma, podemos considerar que na presença de *S. aureus* e *E. coli* a estabilidade de morte celular pode auxiliar MAP a bloquear a apoptose e assim se apresentar viável por mais tempo na glândula mamária, pois em um tempo maior de exposição à infecção, as amostras demonstraram menor expressão de Caspase 9, conseqüentemente menos morte celular por apoptose, quando comparadas com as amostras dos tempos 4 e 12 horas.

Tabela 1. Viabilidade celular de células MAC-T mensurada pela liberação de Caspase 9, obtida de amostras submetidas a ensaios de internalização bacteriana, previamente infectadas com três isolados distintos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) - (K10, ARG e RS) e co-infectadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, realizados nos tempos 4, 12 e 24 horas.

Tratamentos	4 horas		12 horas		24 horas	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
MAP-K10	0,42	0,28	0,35	0,21	1,3b	0,01
MAP-ARG	0,24	0,06	0,38	0,21	0,84b	0,82
MAP-RS	0,55	0,00	0,42	0,45	0,59b	0,34
MAP-K10 + <i>S. aureus</i>	0,24	0,34	0,19	0,05	0,525b	0,11
MAP-ARG + <i>S. aureus</i>	0,39	0,37	0,27	0,02	0,52b	0,23
MAP-RS + <i>S. aureus</i>	0,52	0,09	0,46	0,26	0,39b	0,18
MAP-K10 + <i>S. agalactiae</i>	0,43	0,05	0,37	0,16	0,415b	0,05
MAP-ARG + <i>S. agalactiae</i>	0,13	0,06	0,59	0,62	0,305b	0,21
MAP-RS + <i>S. agalactiae</i>	0,305B	0,06	0,625B	0,49	4,655aA	5,21
MAP-K10 + <i>E. coli</i>	0,78	0,11	0,20	0,09	0,765b	0,28
MAP-ARG + <i>E. coli</i>	0,32	0,36	0,61	0,09	0,885b	0,30
MAP-RS + <i>E. coli</i>	0,35	0,06	0,24	0,06	0,545b	0,77

Letras minúsculas diferentes diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos;

Letras maiúsculas diferentes diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos no mesmo tratamento.

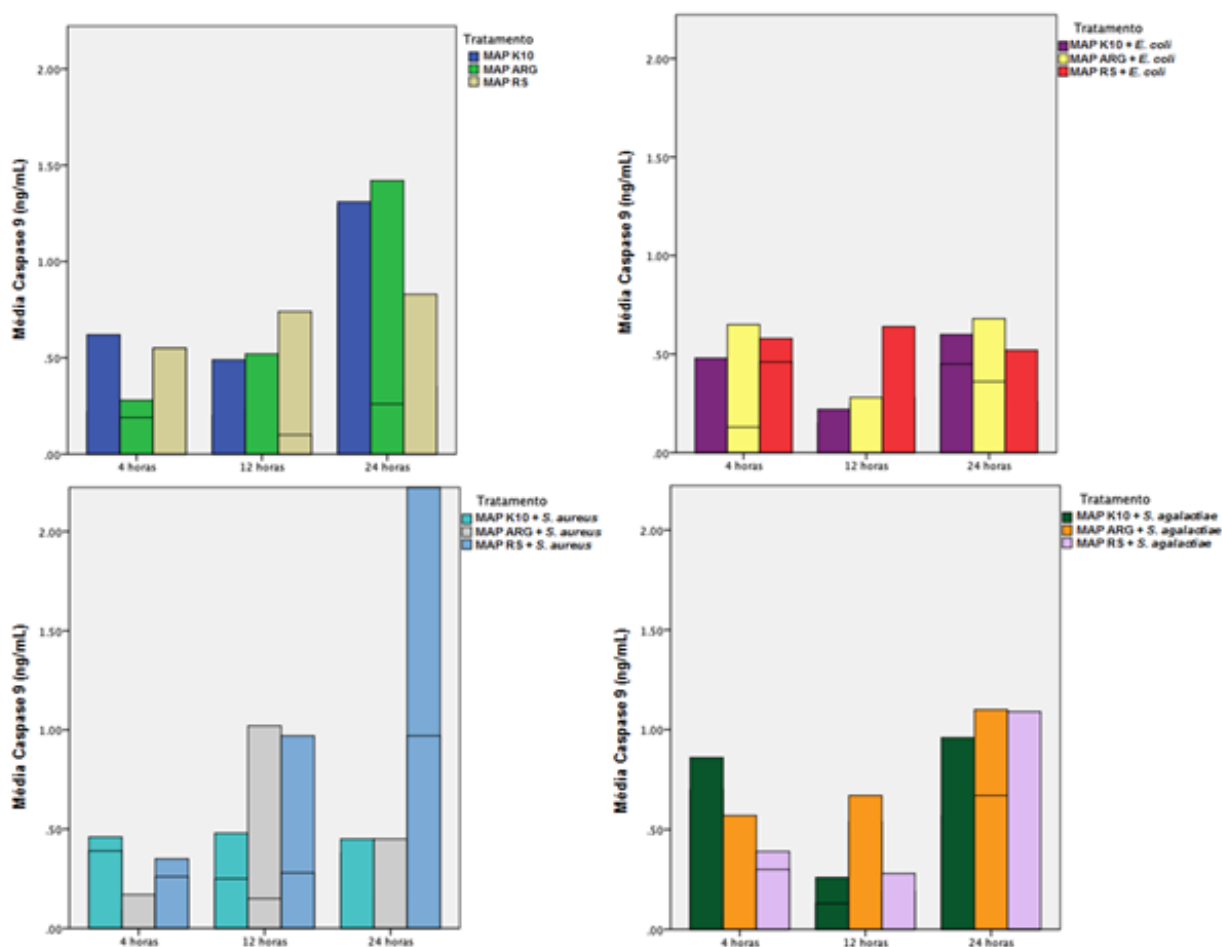


Figura 1. Tratamentos submetidos ao ensaio de Caspase 9, após os ensaios de internalização bacteriana em células MAC-T, previamente infectadas com três isolados distintos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* realizados nos tempos 4, 12 e 24 horas.

A detecção de LDH foi realizada nesse trabalho com a finalidade de avaliar a viabilidade celular das células MAC-T infectadas por distintos de isolados de MAP (K10, ARG e RS), co-infectadas separadamente por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*, em diferentes tempos (Tabela 2).

A enzima LDH, geralmente esta presente no citoplasma e pode ser liberada no meio de cultura celular através das membranas celulares danificadas após infecção bacteriana (Loeffler et al., 2004; Viguier et al., 2009). A mensuração é realizada a partir do sobrenadante dos cultivos celulares, que vem sendo utilizada já há algum tempo em trabalhos que possuem como objetivo determinar a viabilidade celular ou necrose celular por espectrofotometria (Ceciliani et al., 2021).

Comparadas com grupo controle, que se trata de células MAC-T sem infecções, as amostras de células MAC-T infectadas com os diferentes isolados de

MAP e co-infectadas por bactérias de mastite, não houve resultado significativo, demonstrando a presença da viabilidade celular durante os diferentes tempos de experimentação. Esses resultados sugerem a ausência de necrose celular nas amostras analisadas.

No estudo realizado por Pena et al., (2020) a atividade de LDH foi também foi determinada, com intuito de avaliar a viabilidade celular das células MAC-T que se apresentou constante no controles em todos os tempos de experimentação, havendo maior liberação de LDH na presença de MAP co-infectado por *S. aureus* ou *S. agalactiae*. As diferenças estatísticas observadas nesse trabalho são entre os grupos das amostras infectadas pelas diferentes cepas de MAP e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* ou *E. coli*, nos tempo 4, 12 ou 24 h. Em destaque, a amostra MAP-RS + *S. aureus*, que apresentou diferença estatística de 4 h para 12 h, bem como do tempo 4 para 24 horas, demonstrando como já esperado que quanto maior o tempo de infecção maior liberação de LDH. No tempo 4, 12 e 24 horas MAP-RS + *S. aureus* demonstrou liberar mais LDH quanto comparado as demais amostras.

Tabela 2. Viabilidade celular de células MAC-T mensurada pela liberação de lactado desidrogenase (LDH), obtida de amostras submetidas a ensaios de internalização bacteriana, previamente infectadas com três isolados distintos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) - (K10, ARG e RS) e co-infectadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, realizados nos tempos 4, 12 e 24 horas.

Tratamentos	4 Horas		12 horas		24 horas	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
MAP-K10	0,65a	0,01	0,67a	0,01	0,66a	0,01
MAP-ARG	0,68a	0,01	0,70	0,01	0,72b	0,03
MAP-RS	0,69	0,01	0,69ac	0,02	0,70	0,02
MAP-K10 + <i>S. aureus</i>	0,66a	0,01	0,67a	0,01	0,68a	0,01
MAP-ARG + <i>S. aureus</i>	0,74b	0,02	0,75b	0,02	0,74b	0,02
MAP-RS + <i>S. aureus</i>	0,68aA	0,03	0,73b B	0,01	0,72b B	0,02
MAP-K10 + <i>S. agalactiae</i>	0,66a	0,01	0,66a	0,01	0,67a	0,01
MAP-ARG + <i>S. agalactiae</i>	0,71b	0,01	0,73b	0,01	0,74b	0,02
MAP-RS + <i>S. agalactiae</i>	0,72b	0,01	0,72b	0,01	0,72b	0,03
MAP-K10 + <i>E. coli</i>	0,67a	0,01	0,65a	0,03	0,66a	0,03
MAP-ARG + <i>E. coli</i>	0,73b	0,02	0,72bc	0,01	0,70	0,03
MAP-RS + <i>E. coli</i>	0,72b	0,01	0,74bc	0,07	0,71	0,03

Letras minúsculas diferentes diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos;

Letras maiúsculas diferentes diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos no mesmo tratamento.

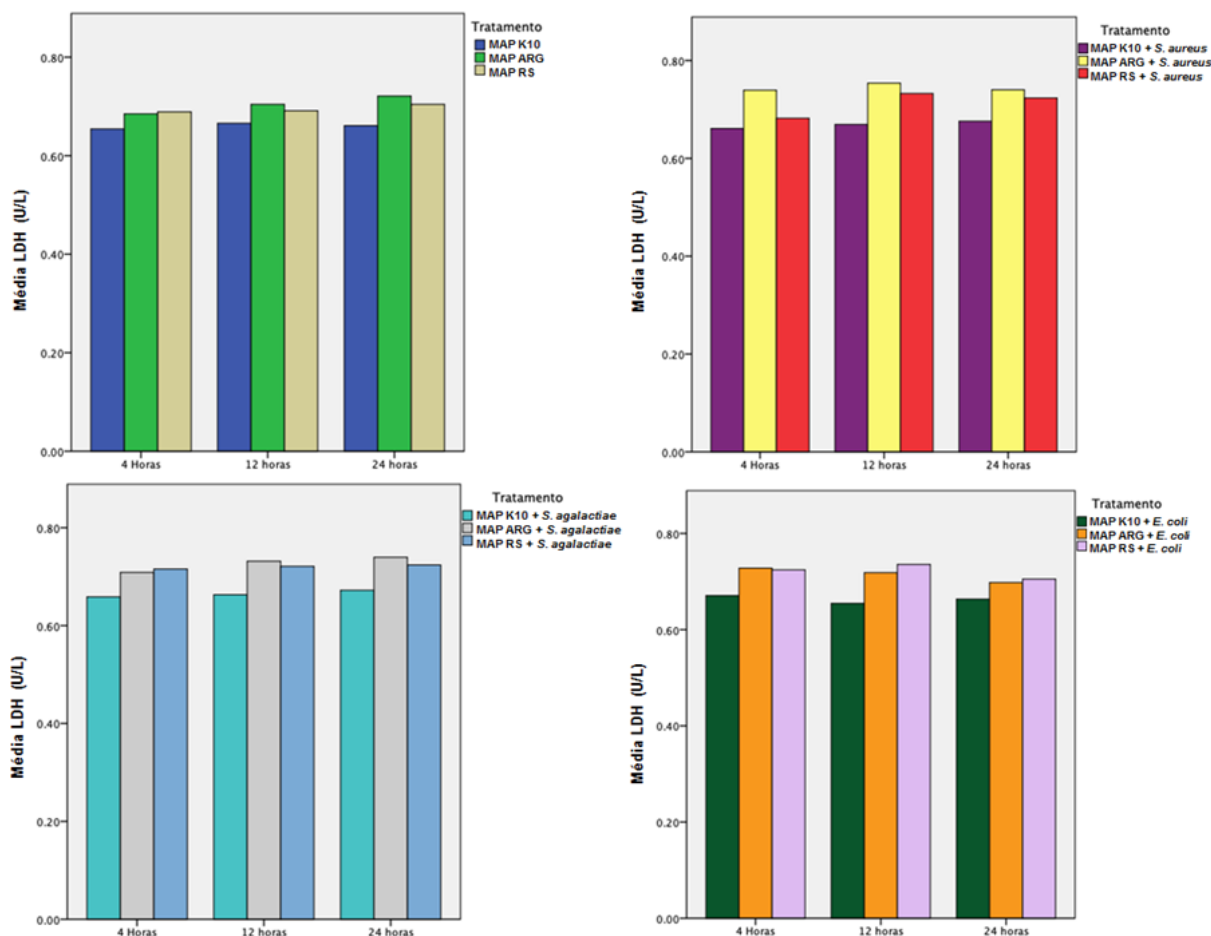


Figura 2. Liberação de lactato desidrogenase (LDH) das células epiteliais mamárias submetidas à ensaios de internalização bacteriana, previamente infectadas com 3 isolados distintos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente com *Staphylococcus aureus* realizados nos tempos 4, 12 e 24 horas. A absorvância a 490 nm foi detectada. Os dados foram a média de amostras em triplicatas realizadas em 3 repetições biológicas.

Com intuito de também avaliar a morte celular foi realizada uma técnica não convencional com iodeto de propídio (PI) adicionado aos cultivos celulares de MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas separadamente por *E. coli*, *S. aureus* ou *S. agalactiae*, sendo detectada a fluorescência do corante em um leitor de microplacas (Tabela 3). Essa técnica foi adotada considerando a inviabilidade da utilização da citometria de fluxo, considerando o fato dos ensaios serem com células aderentes.

Nos ensaios de infecção e co-infecção com MAP K10 (Figura 3-a) houve diferença significativa entre: MAP K10 e MAP K10 + *S. aureus* as 4 horas ($P=0,022$); MAP K10 + *S. aureus* e MAP K10 + *E. coli* as 4 horas ($P= 0,046$); MAP K10 e Controle K10 as 4 horas ($P=0,012$); MAP K10 + *E. coli* e Controle K10 as 4 horas ($P=0,012$); MAP K10 + *S. aureus* e MAP K10 + *E. coli* as 12 horas ($P=0,002$) MAP

K10 + *S. agalactiae* e MAP K10 + *E. coli* as 12 horas (0,006); MAP K10 e MAP K10 + *S. aureus* as 24 horas (P=0,012); MAP K10 e Controle K10 as 24 horas (P=0,039); MAP K10 + *S. aureus* e MAP K10 + *E. coli* as 24 horas (P= 0,002); e entre MAP K10 + *E. coli* e controle K10 (P=0,006).

Nos ensaios de infecção e co-infecção com MAP ARG (Figura 3-b), houve diferença significativa entre MAP ARG + *E. coli* e MAC-T as 4 horas (P=0,025); MAP ARG + *E. coli* e MAC-T as 12 horas (P=0,005); MAP ARG + *E. coli* e MAP ARG + *S. agalactiae* as 12 horas (P<0.0001); MAP ARG + *E. coli* e MAP ARG as 12 horas (P= 0,001); e entre MAP ARG + *E. coli* e MAC-T as 24 horas (P= 0,031).

O iodeto de propídio tem capacidade de entrar na célula, passando através da membrana nuclear rompida, onde se intercala no DNA, causando fluorescência vermelha no núcleo (Darzynkiewicz et al., 1992; Vermes et al., 1995; Vermes et al., 2000). Independente da não precisão quanto o processo exato de morte celular, é evidente que durante os ensaios houve redução da viabilidade celular quando infectada por MAP e co-infectada por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*, havendo maior discrepância no tempo 4 h, redução no tempo 12 h e um novo aumento no tempo 24 h, demonstrando uma oscilação na mensuração do iodeto de propídio.

Essa característica é observadas em patógenos intracelulares como as micobactérias, que podem induzir a ativação de mecanismos apoptóticos menos intensos em comparação com cepas avirulentas ou atenuadas, confirmando as estratégias que esses patógenos desenvolvem para bloquear a apoptose e assim garantir a sobrevivência das células hospedeiras (Keane et al., 2000). Desta forma, podemos considerar que na presença de bactérias de mastite, a estabilidade de morte celular pode auxiliar MAP a bloquear a apoptose e assim se apresentar viável por mais tempo na glândula mamária.

Tabela 3. Detecção de iodeto de propídio em células MAC-T, submetidas a ensaios de internalização bacteriana, previamente infectadas com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) - K10, RS e ARG, co-infectadas por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, realizados nos tempos 4, 12 e 24 horas.

Tratamento	4 horas		12 horas		24 horas	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
MAP-K10	3,61c	0,69	2,55	0,34	3,47bd	0,73
MAP-ARG	5,23cdA	0,87	2,74B	0,18	5,14bcdA	0,98
MAP-RS	4,09bcA	0,67	2,17B	0,46	4,1bcA	0,73
MAP-K10 + <i>S. aureus</i>	8,17aA	2,57	2,22B	0,56	8,09aA	2,6
MAP-ARG + <i>S. aureus</i>	5,3bA	0,92	1,89bB	0,17	5,22bcdA	0,92
MAP-RS + <i>S. aureus</i>	6,57aA	0,6	2,73B	0,22	6,46acdA	0,84
MAP-K10 + <i>S. agalactiae</i>	5,36bcdA	1,64	1,86bB	0,42	5,11bcdA	1,34
MAP-ARG + <i>S. agalactiae</i>	5,22bcdA	0,3	1,69bB	0,11	5,28bcdA	0,26
MAP-RS + <i>S. agalactiae</i>	5,75dA	0,28	1,69bB	0,04	5,65adA	0,31
MAP-K10 + <i>E. coli</i>	2,97b	0,51	4,33	1,87	2,98bd	0,47
MAP-ARG + <i>E. coli</i>	7,1dA	1,86	4,73aB	0,46	7,08acdA	2,04
MAP-RS + <i>E. coli</i>	6,61dA	1,52	3,61B	0,42	6,52acdA	1,56

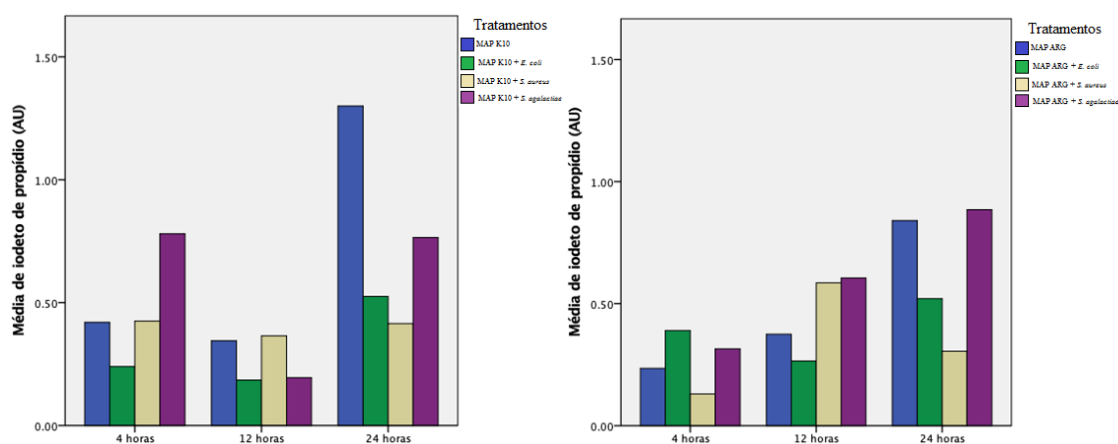


Figura 3. Comparação entre os tratamentos submetidos ao ensaio de Iodeto de Propídio, após os ensaios de internalização bacteriana em células MAC-T, previamente infectadas *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) K10 (a) e ARG (b), co-infectadas separadamente com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* realizados nos tempos 4, 12 e 24 horas.

Os ensaios in vitro induziram a inflamação das células MAC-T, uma vez infectadas por diferentes isolados de MAP e co-infectadas por bactérias causadoras de mastite bovina, comprometendo a viabilidade dessas células, confirmada pela liberação de Caspase 9 e de Iodeto de propídio, indicando apoptose celular.

Em estudo realizado por Pena et al., (2020) mostraram que nas células MAC-T previamente infectadas por MAP e posteriormente por *S. aureus*, houve uma rápida internalização nos primeiros 10 minutos, mantendo um maior número de bactérias internalizadas durante todos os tempos de exposição, e quando co-infectada por *S. agalactiae*, não houve alterações nos padrões de internalização.

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

Estudos realizados por Bayles et al. (1998), relataram que em estudos realizando desafios em células MAC-T infectadas por *S. aureus* houve a indução de apoptose celular. A capacidade de *S. aureus* de invadir e sobreviver dentro das células epiteliais mamárias, confere proteção contra o sistema imune do hospedeiro e o tratamento com antibióticos, está entre os fatores que contribuem para a persistência desse patógeno, levando a uma infecção intramamária crônica (Oviedo-Boyso et al., 2008).

A produção de uma variedade de fatores de virulência também contribui para a patogenicidade de *S. agalactiae*, incluindo toxinas, enzimas e outros componentes moleculares que contribuem para a destruição dos tecidos do hospedeiro e facilitam a sobrevivência bacteriana (Liu et al., 2022). *S. agalactiae* pode causar infecções intramamárias persistentes, indicando sua sobrevivência e adaptação, modulando a resposta dos neutrófilos para promover a sobrevivência bacteriana (Ma et al., 2022). Para o estabelecimento da infecção, ao entrar no úbere, *S. agalactiae* adere às células epiteliais que revestem os ductos mamários, facilitado por várias proteínas de superfície e adesinas (Pietrocola et al., 2018).

Um fator de virulência presente em *E. coli* é a formação de biofilmes, que as tornam mais resistentes à fagocitose, agentes antimicrobianos e desinfetantes (Pedersen et al., 2021). Também é verificada uma ampla variedade de genes que são responsáveis pela codificação de fatores de virulência que incluem as toxinas, adesinas, sideróforos, proteínas de membrana que ajudam a escapar do sistema imunológico do hospedeiro e lipopolissacarídeos (Chen et al., 2017).

Estudos mostram que a infecção por MAP na glândula mamária pode ser influenciada pelo leite e pela presença de coinfeções, como demonstrando por Schwarz et al., (2018) onde a presença de *E. coli* em células MAC-T foi capaz de facilitar a translocação de MAP da região basal para a região apical das células epiteliais mamárias até 30 minutos após a infecção. Segundo Long et al. (2001), o desafio com *E. coli* intramamária induziu a apoptose de MEC em glândulas mamárias bovinas em lactação. A existência de processos co-infectivos e cooperação entre esses microrganismos podem exacerbar os processos de morte celular, assim como evidenciado em nossos resultados.

Segundo Petzl et al., (2018) *E. coli* pode colonizar e sobreviver na glândula mamária bovina, desencadeando uma resposta imunológica e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse aumento de ROS implica em morte celular, devido aos danos que irá causar ao ácido desoxirribonucléico (DNA) (Shahid et al., 2017), sendo um mecanismo que pode justificar a intensificação dos processos de apoptose em células MAC-T quando co-infectadas por *E. coli*.

A produção de leite é uma função de células epiteliais mamárias secretoras (MEC) e de sua atividade secretora (Capuco et al., 2001), desta forma a redução celular devido aos processos apoptóticos e/ou necróticos implica na diminuição da produção de leite. Caso essa experimentação ocorresse in vivo, os processos de danos e comprometimentos celulares poderiam ocasionar ou intensificar enfermidades na glândula mamária, impactando na sanidade dos animais acometidos e na produção.

As infecções por MAP com co-infecções por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae* em células MAC-T aumentaram a liberação de Caspase 9 e Iodeto de Propídio indicando comprometimento da membrana das células epiteliais mamárias, podendo ocasionar em morte celular por apoptose.

Para garantir a presença de MAP nas amostras de células MAC-T infetadas por diferentes isolados de MAP (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, durante todos os tempos de experimentação (4, 12 e 24 horas), foi realizada a extração de DNA, e posteriormente os DNAs extraídos foram submetidos ao ensaio molecular de qPCR. Os ensaios demonstram a presença de MAP em todas as amostras, que foram expressas em valores de Ct -

Cycle threshold, com variações de concentração mínima de 13,61 Ct e máxima de 38,89 Ct dentre as amostras analisadas. Conforme informado pelo fabricante do kit, 8 µL do controle positivo correspondem a 30 qt, que por sua vez corresponde a 200 cópias genômicas e a $8,73 \times 10^7$ UFC / mL de MAP.

O padrão de expressão gênica pró-apoptótica (Bax) e anti-apoptótica (Bcl2) foi analisado por qPCR em amostras de RNA transcritas para cDNA de células MAC-T infectadas por diferentes isolados de MAP (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, nos tempos 4, 12 e 24 horas (Tabelas 4 e 5).

A expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 pode ser observada significativamente nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada por MAP-ARG co-infectado por *E. coli*. Todas as amostras de MAC-T infectadas por MAP-RS também tiveram uma expressão do gene Bcl2 considerável, porém no tempo 12 horas (Figura 4).

O valor da concentração dos genes em células MAC-T corresponde a 1,0. Desta forma, é possível observar que os valores de expressão do gene Bcl2 no tempo de 4 horas são muito próximos do valor do grupo controle, que trata-se da célula MAC-T.

Células MAC-T infectadas com MAP-K10 co-infectado por *S. agalactiae* demonstrou nos tempos 4 e 24 horas, maior expressão gênica quando comparado aos demais grupos de co-infecção (Figura 4-a). Já o MAP-ARG demonstrou maior expressão de Bcl2 quando co-infectado por *E. coli* no tempo 24 horas (Figura 4-b). E por fim MAP-RS co-infectado por *S. aureus* no tempo 12 horas (Figura 4-c).

Tabela 4. Expressão do gene Bcl2 detectada por qPCR em amostras de células MAC-T infectadas por diferentes isolados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nos tempos 4, 12 e 24 horas.

	TEMPO		
	4 horas	12 horas	24 horas
MAP K10	1,214195	----	7750,104
MAP K10 + <i>S. aureus</i>	1,414214	0,198884	2105,577
MAP K10 + <i>S. agalactae</i>	1,580083	0,004876	3983,995
MAP K10 + <i>E. coli</i>	1,156688	0,020761	3125,779
MAP ARG	1,172835	----	107,5105
MAP ARG + <i>S. aureus</i>	0,97942	1,753211	6509,51
MAP ARG + <i>S. agalactae</i>	1,717131	0,646176	107,5105
MAP ARG + <i>E. coli</i>	-----	0,042394	6375,547
MAP RS	0,486327	29944,43	x
MAP RS + <i>S. aureus</i>	1,049717	40342,14	x
MAP RS + <i>S. agalactae</i>	1,404445	52,34573	x
MAP RS + <i>E. coli</i>	14,12325	55,71524	x

Valores dados em escala logarítmica. Concentração dos genes em células MAC-T = 1,0.

----: ausência da expressão gênica;

X: amostra não analisada



Figura 4. Expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 em amostras de células MAC-T infectadas por diferentes isolados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nos tempos 4, 12 e 24 horas. (a): isolado de MAP-K10; (b): isolado de MAP-ARG; e (c): isolado de MAP-RS.

A expressão do gene pró-apoptótico Bax pode ser observada significativamente nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada também por MAP-10 porém co-infectado por *S. agalactiae*. Todas as amostras de MAC-T infectadas por MAP-ARG e MAP-RS também tiveram uma expressão do gene Bax considerável, porém no tempo 24 horas e 12 horas, respectivamente (Figura 5).

O valor da concentração dos genes em células MAC-T corresponde a 1,0. Desta forma, é possível observar que os valores de expressão do gene Bax no tempo de 4 horas em sua grande maioria estão abaixo são do valor do grupo controle, que se trata da célula MAC-T.

Células MAC-T infectadas com MAP-K10 co-infectado por *S. agalactiae* demonstrou nos tempos 4 e 24 horas, maior expressão gênica quando comparado aos demais grupos de co-infecção (Figura 5-a). Já o MAP-ARG e o MAP-RS

demonstrou maior expressão de Bax quando co-infectado por *S. aureus* no tempo 24 horas (Figura 8-b) e no tempo 12 horas (Figura 5-c), respectivamente.

Tabela 5. Expressão do gene Bax detectada por qPCR em amostras de células MAC-T infectadas por diferentes isolados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nos tempos 4, 12 e 24 horas.

	TEMPO		
	4 horas	12 horas	24 horas
MAP K10	0,687771	-----	2452,436
MAP K10 + <i>S. aureus</i>	0,550953	-----	704,2774
MAP K10 + <i>S. agalactiae</i>	0,664343	0,278034	1937,526
MAP K10 + <i>E. coli</i>	0,316439	0,16647	625,9918
MAP ARG	0,378929	5,35171	26,78463
MAP ARG + <i>S. aureus</i>	0,033493	1,658639	1263,608
MAP ARG + <i>S. agalactiae</i>	0,586417	1,931873	373,078
MAP ARG + <i>E. coli</i>	1,006956	3,031433	998,3026
MAP RS	0,358489	2452,436	X
MAP RS + <i>S. aureus</i>	0,574349	115,3601	X
MAP RS + <i>S. agalactiae</i>	0,554785	5,696201	X
MAP RS + <i>E. coli</i>	1,753211	2,531513	X

Valores dados em escala logarítmica. Concentração dos genes em células MAC-T = 1,0.

-----: ausência da expressão gênica;

X: amostra não analisada

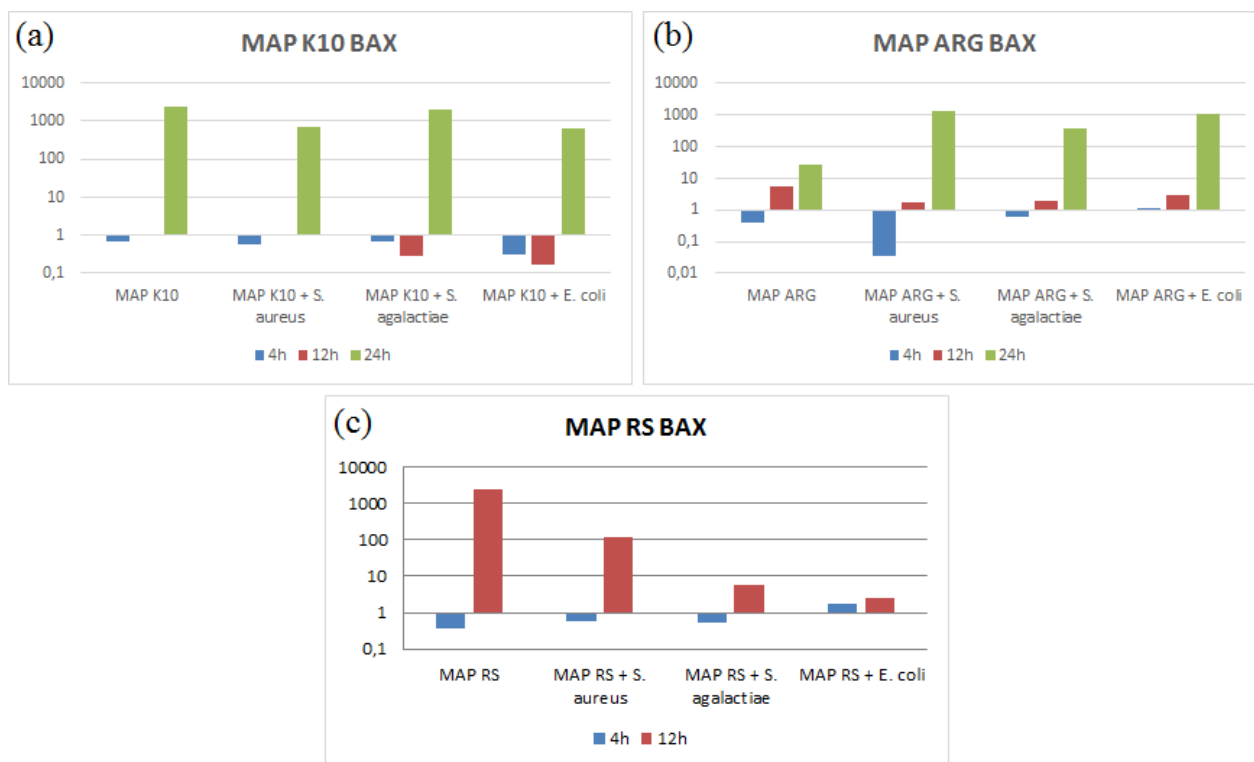


Figura 5. Expressão do gene pró-apoptótico Bax em amostras de células MAC-T infectadas por diferentes isolados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (K10, ARG e RS) e co-infectadas separadamente por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nos tempos 4, 12 e 24 horas. (a): isolado de MAP-K10; (b): isolado de MAP-ARG; e (c): isolado de MAP-RS.

Proteínas pró-apoptóticas (Bax), e proteínas apoptóticas (Bcl2), podem alterar à permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), desencadeando indução de apoptose pela via intrínseca podendo causar a difusão de numerosas proteínas para o citosol que normalmente residem no espaço entre as membranas mitocondriais externa (OMM) e interna (IMM) (Dewson, et al., 2009; Tait et al., 2010).

A proteína antiapoptótica Bcl-2 pode inibir o dano à membrana que será mediado por radicais livres de oxigênio e assim prevenir a liberação do citocromo C mitocondrial, enquanto que a proteína pró-apoptótica Bax, poderá alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial e liberar o citocromo C, ocasionando em apoptose celular (Adams e Cory, 1998; Eskes et al., 1998). Assim como é visto pela Caspase 9, que quando ativada é um importante amplificador intracelular da sinalização de caspases a jusante da via de apoptose mitocondrial, ocasionando reação em cascata mediada pela caspase 3 que irá resultar em apoptose (Li et al., 2019).

No estudo realizado por Chaudhary et al., (2018), a menor quantidade proteica de Bcl-2 e a maior quantidade proteica de Bax, caspase 9 e caspase 3 fornecem evidências de que a via apoptótica Bcl-2/caspase9 foi ativada nas glândulas mamárias de vacas cetóticas. Essa correlação pode ser realizada com os ensaios de co-infecção em células MAC-T desse trabalho, onde foram evidenciados aumentos consideráveis na liberação de Caspase 9 e expressão do gene Bax. Canção et al. (2014) relataram que os ácidos graxos induziram a apoptose de hepatócitos bovinos aumentando a produção de ERO, alterando a proporção de Bax para Bcl-2 e ativando a via caspase 9/ caspase 3.

A expressão do gene Bcl-2, anti-apoptótico também foi evidenciada nas amostras analisadas e pode estar correlacionada com mecanismos em que MAP utiliza para sobrevivência intracelular, como se observa em macrófagos, podendo ser também um comportamento semelhante o em células MAC-T. Em estudos realizados por Wang et al., 2018, o ácido gama-aminobutírico (GABA) foi descrito com a capacidade de aumentar a viabilidade celular e regular positivamente os níveis de moléculas anti-apoptóticas Bcl-2, que foi inibida significativamente, podendo suprimir a apoptose celular e assim modular a expressão de marcadores apoptóticos.

A expressão do gene anti-apoptótico Bcl2 foi observada significativamente nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque quando MAC-T foi infectada por MAP-K10 sem co-infecção, seguida da amostra de MAC-T infectada por MAP-ARG co-infectado por *E. coli*. Esse resultado demonstra que a presença do gene anti-apoptótico se expressa de modo a garantir a viabilidade de MAP nas células MAC-T, e também quando co-infectado por *E. coli*, que pode estar contribuindo para permanência de MAP nessas células e vice-versa.

Já a presença do gene pró-apoptótico Bax observada nas amostras com tempo de 24 horas, em destaque MAC-T infectada por MAP-K10 e co-infectada por *S. agalactiae*, pode sugerir que a presença de *S. agalactiae* intensifica os processos de morte celular não favorecendo a viabilidade de MAP dentro das células MAC-T.

A determinação dos genes Bax e Bcl2 proporcionou uma compreensão genotípica dos padrões inflamatórios, demonstrando um comprometimento apoptótico significativo em células MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que houve redução da viabilidade de células MAC-T quando infectadas por MAP-RS e co-infectadas com *S. agalactiae*, no tempo 24 h apresentando uma maior expressão de caspase 9 e maior mensuração de iodeto de pródio quando infectadas por MAP-RS co-infectado por *E. coli* no tempo 4 h, indicando morte celular por apoptose.

A cepa de MAP-RS, um isolado de campo, também apresentou maior quantidade proteica de Bax e caspase 9 marcadas nas amostras, evidenciando que a via apoptótica Bcl-2/caspase9 foi ativada em células MAC-T, como comumente é evidenciado na glândula mamária.

Os ensaios de mensuração de LDH sugerem a ausência de necrose celular nas amostras analisadas.

Suspeita-se que a interação entre esses patógenos possa favorecer a permanência dos mesmos no úbere e intensificar processos inflamatórios. Porém trata-se de mecanismos de interações bacterianas ainda não compreendidos. Por mais que os resultados desse trabalho demonstram certa influência dessas cooperações microbianas, torna-se necessário a realização de estudos futuros com intuito de elucidar essa correlação dentre os microrganismos, e principalmente confirmar se esses comportamentos também acontecerão in vivo, para que possamos afirmar fidedignamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, 281(5381), 1322-1326.

Alam, A., et al., (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. The **Journal of experimental medicine**, 190(12), 1879-1890.

Bardiau, M., et al., (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, 169(1-2), 74-79.

Bayles, K. W., et al., (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infection and immunity**, 66(1), 336-342.

Betsaida Bibo-Verdugo; et al., (2023). Caspase-Regulated Mechanisms of Cell Death. **Encyclopedia of Cell Biology** (Second Edition).

Bouzon, Z. L., et al., (2010). **Biologia celular**. 2. ed. Florianópolis: 238p. ISBN 978-85-61485-34-4.

Byrne, A., et al., (2023). Investigating in vivo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* microevolution and mixed strain infections. **Microbiology Spectrum**, 11(5), e01716-23.

Cadona, J. S., et al., (2021). Draft genome sequence of *Streptococcus agalactiae* TA B490, a multidrug-resistant strain isolated from bovine mastitis in Argentina. **Microbiology Resource Announcements**, 10(5), 10-1128.

Capuco, A. V., et al., (2001). Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. **Journal of dairy science**, 84(10), 2177-2187.

Ceciliani, F., et al., (2021). Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. **Methods**, 186, 22-41.

Chaudhary, A., et al., (2018). A glycoprotein from mammary gland secreted during involution promotes apoptosis: Structural and biological studies. **Archives of biochemistry and biophysics**, 644, 72-80.

Chen, W., et al., (2017). Cloning, Expression, and Immunogenicity of Fimbrial-F17A Subunit Vaccine against *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis. **BioMed Research International**, 2017(1), 3248483.

Dan, P., et al., (2024). Bioinsecticide PA1b alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation and impairment of bovine mammary epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 201, 105866.

D'arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.

Darzynkiewicz, Z., et al., (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13(8), 795-808.

De Matteis, G., et al., (2023). Detecção citométrica de fluxo da produção de IFN- γ e ativação de Caspase-3 em linfócitos T CD4+ para discriminar entre búfalos saudáveis e naturalmente infectados por *Mycobacterium bovis*. *Tuberculose*, 139, 102327.

Deleo, J. A., et al., (2004). Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *The Neuroscientist*, 10(1), 40-52.

Del Re, D. P., et al., (2019). Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiological reviews*, 99(4), 1765–1817.

Derrick, S. C., & Morris, S. L. (2007). The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular microbiology*, 9(6), 1547-1555.

Dewson, G., & Kluck, R. M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of cell science*, 122(16), 2801-2808.

Eskes, R., et al., (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *The Journal of cell biology*, 143(1), 217-224.

Fratazzi, C., et al., (1997) Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 158: 4320–4327.

Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.

Jöhne, H. A., & Frothingham, L. (1895). Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rinde. Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende *Pathologie*, 21, 438-54.

Keane, J., et al.,. (2000). Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, 164(4), 2016-2020.

Kiraz, Y., et al., (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(7), 8471–8486.

Kook, S., et al., (2019). Cleavage of arrestin-3 by caspases attenuates cell death by precluding arrestin-dependent JNK activation. *Cellular signalling*, 54, 161-169.

Kutschepa, D. et al. (2009) O uso indiscriminado de antibióticos na bovinocultura leiteira uma análise dos riscos para o meio ambiente e a saúde humana. In: **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, 4, Anais... São Paulo: ANAP.

Li, L., et al., (2022). Matrine attenuates bovine mammary epithelial cells inflammatory responses induced by *Streptococcus agalactiae* through inhibiting NF- κ B and MAPK signaling pathways. **International Immunopharmacology**, 112, 109206.

Liu, Y., & Liu, J. (2022). Group B streptococcus: virulence factors and pathogenic mechanism. **Microorganisms**, 10(12), 2483.

Loeffler, D. A., et al., (2004). Characterization of dopamine-depleting activity of *Nocardia asteroides* strain GUH-2 culture filtrate on PC12 cells. **Microbial pathogenesis**, 37(2), 73-85.

Long, E., et al., (2001). *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. **Cell Death & Differentiation**, 8(8), 808-816.

Ma, F., et al., (2022). Effect of multiplicity of infection on the evasion of neutrophil killing by *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis bovine. **Veterinary Microbiology**, 270, 109450.

Mohareer, K., et al., (2018). Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis** (Edinburgh, Scotland), 113, 99–121.

Molloy, J. B., et al., (1994). Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. **Veterinary microbiology**, 39(3-4), 323-333.

Nandi, B., & Behar, S. M. (2011). Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. **Journal of Experimental Medicine**, 208(11), 2251-2262.

Orsi, H., et al., (2023). Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil. **Journal of dairy science**, 106(2), 1403-1413.

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

Pena, J. L., et al., (2020). Differences in the coinfective process of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in bovine mammary epithelial cells infected by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. **Microbial Pathogenesis**, 149, 104476.

- Pedersen, R. R., et al., (2021). Biofilm research in bovine mastitis. **Frontiers in veterinary science**, 8, 656810.
- Pereira, V.; et al., (2009). Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiol.** 26:278–282.
- Petzl, W., et al., (2018). Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. **Research in Veterinary Science**, 116, 55-61.
- Pietrocola, G., et al., (2018). *Streptococcus agalactiae* non-pilus, cell wall-anchored proteins: involvement in colonization and pathogenesis and potential as vaccine candidates. **Frontiers in immunology**, 9, 602.
- Pritchard, T. C., et al., (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 100(1), 679-690.
- Ramirez M. L. G & Salvesen G. S. (2018) A primer on caspase mechanisms. **Semin Cell Dev Biol**, 82: 79–85.
- Ramon-Luing, L. A., et al., (2022). Diverse cell death mechanisms are simultaneously activated in macrophages infected by virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Pathogens**, 11(5), 492.
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, 8(5), 405-413.
- Rieger, A. M., et al.,. (2010). Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. **Journal of immunological methods**, 358(1-2), 81-92.
- Scarpellini, R., et al., (2023). Bovine paratuberculosis: results of a control plan in 64 dairy farms in a 4-year period. **Preventive Veterinary Medicine**, 215, 105923.
- Schwarz, D. G. G., et al., (2018). Rapid baso-apical translocation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in mammary epithelial cells in the presence of *Escherichia coli*. **Journal of dairy science**, 101(7), 6287-6295.
- Shahid, M., et al., (2017). Prototheca zopfii isolated from bovine mastitis induced oxidative stress and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. **Oncotarget**, 8(19), 31938.
- Sharun, K., et al., (2021). Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, 41(1), 107-136.
- Specian, A. F. L., et al., (2016). LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. **Cytotechnology**, 68, 2729-2744.

Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 621-632.

Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.

Vermes, I., et al., (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection significance of apoptosis of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184(1), 39-51.

Vermes, I., et al., (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), 167-190.

Viguiet, C., et al., (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in biotechnology*, 27(8), 486-493.

Wang, Y. Y., et al., (2018). GABA regulates the proliferation and apoptosis of MAC-T cells through the LPS-induced TLR4 signaling pathway. *Research in veterinary science*, 118, 395-402.

Yamada, A., et al., (2017). Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Frontiers in immunology*, 8, 403.

Zhao, Y., Tang, J., Yang, D., Tang, C., & Chen, J. (2020). Staphylococcal enterotoxin M induced inflammation and impairment of bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, 103(9), 8350-8359.

Zhao, X., et al., (2022). Deoxynivalenol exposure inhibits biosynthesis of milk fat and protein by impairing tight junction in bovine mammary epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 237, 113504.

Zhuang, C., et al., (2020). In vitro immune responses of bovine mammary epithelial cells induced by Escherichia coli, with multidrug resistant extended-spectrum β -lactamase, isolated from mastitic milk. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104494.

CONCLUSÕES GERAIS

Com o entendimento dos mecanismos de evasão de MAP revisados nesse trabalho podemos mensurar possibilidades de evasão em células epiteliais, direcionando estudos que futuramente possam confirmar e melhor elucidar esses mecanismos, para melhor compreensão da patofisiologia desse agente, e seus reais impactos na glândula mamária, principalmente quando relacionados à viabilidade celular.

Concluimos que processos de morte celular por apoptose foram detectados, quantificados pela liberação e determinação de Caspase 9, Iodeto de Propídio, marcação gênica de Bax e Bcl2, podendo estar relacionados às vias extrínseca e intrínseca, causando dano mitocondrial e conseqüentemente morte das células MAC-T infectadas por MAP e co-infectadas por *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae*.

Quando infectadas por MAP e co-infectadas por bactérias causadoras de mastite bovina, as células MAC-T tiveram uma redução considerável em sua viabilidade celular, em destaque para MAP-RS, um isolado de campo, co-infectado por *S. agalactiae* nos tempos 4 h, 12 h e 24 h. Pelos ensaios de caspase 9, podemos influir que quanto mais tempo de duração dos processos de infecção e co-infecção, mais haverá a morte celular por apoptose.

Os ensaios de LDH demonstrando a presença da viabilidade celular durante os diferentes tempos de experimentação, e desta forma sugerem a ausência de necrose celular nas amostras analisadas. Já os ensaios de Iodeto de Propídio demonstraram uma oscilação, sendo mais expressivos no tempo 4 h que no tempo 12 h, onde houveram uma redução na expressão de PI, que aumenta novamente no tempo 24 h. Tal comportamento é característico de micobactérias, que podem induzir a ativação de mecanismos apoptóticos menos intensos em comparação com cepas avirulentas ou atenuadas, confirmando as estratégias que esses patógenos desenvolvem para bloquear a apoptose e assim garantir a sobrevivência das células hospedeiras.

Desta forma, podemos considerar que na presença de bactérias de mastite, a estabilidade de morte celular pode auxiliar MAP a bloquear a apoptose e assim se apresentar viável por mais tempo na glândula mamária.