IZADORA DE SOUZA REZENDE

Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a *Ureaplasma diversum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

IZADORA DE SOUZA REZENDE

Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a *Ureaplasma diversum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rezende, Izadora de Souza
Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a Ureaplasma diversum / Izadora de Souza Rezende; orientador Jorge Timenetsky. -- São Paulo, 2016.
82 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ureaplasma diversum. 2. Imunogenicidade. 3. Macrófagos. 4. Blastocistos. 5. Bovinos. I. Timenetsky, Jorge, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Izadora de Souza Rezende

Titulo da Dissertação/Tese: Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a *Ureaplasma diversum.*

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **87** nas fls. **22** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jorge Timenetsky,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização da resposta de mórulas e macrófagos bovinos após a infecção por Ureaplasma diversum*" do qual participam o(s) aluno(s) **Izadora de Souza Rezende,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.08.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha família, especialmente aos meus pais, Teodoro e Elizete, pelo referencial de força e fé e pelo apoio imensurável para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nº do processo 443300/ 2014-3 pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a graça de poder vencer os desafios, a capacidade de seguir em frente e pela certeza de Sua constante presença. Sem essa força vital, não seria possível tudo isso.

Aos meus pais, Teodoro e Liza, minha base sólida, incentivo, exemplo, por iluminarem meu caminho e serem meu referencial de força e fé. Apesar da distância, vocês sempre fizeram de tudo para que eu me sentisse mais próxima de casa e para transmitirem todo o amor de vocês. Sem esse alicerce, esse trabalho não seria possível. Vocês são o meu coração batendo fora do meu corpo!Eu amo vocês!!!

Às minhas irmãs, Izabela e Izaura, pela companhia de sempre e pelas risadas proporcionadas. Por fazerem meu papel quando ausente em casa e mostrarem o amor incondicional.

Aos meus avós, especialmente à minha avó Terezinha *(in memorian),* anjo no céu! Palavras não são suficientes para agradecer tudo o que sempre fez por mim, por nós. Por sempre vibrar pelas minhas conquistas mesmo sem entender muito bem o que eram todos os papéis que te mostrava ou saber bem o que eu fazia. Você sempre se entusiasmava pelas minhas conquistas e me incentiva a prosseguir. Por entender que São Paulo estava longe, e me receber como se eu estivesse sempre por perto. Nada basta para expressar o meu amor e gratidão.

Aos meus tios, tias, primos e primas, pelo incentivo constante e pelos reencontros calorosos e amorosos. Obrigada pela torcida pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timenetsky, pelas oportunidades proporcionadas e pela convivência. Por incentivar o amor pela pesquisa e pela micoplasmologia, pelas conversas francas e conselhos. Por todo o conhecimento compartilhado e por mostrar a humanidade em um trabalho sempre bem feito.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, pelo conhecimento, oportunidades e pela confiança depositada. Por mostrar que é possível ser professor, orientador, amigo, pai, irmão...agradeço pela amizade e por todos os conselhos e puxões de orelha. Você é fundamental para a concretização de tudo isso.

A Abrahão pela convivência, paciência e amor oferecido; por me ouvir, me apoiar, aconselhar e por sempre acreditar no meu potencial. Seu carinho, atenção e presença são essenciais pra mim. Obrigada por ser o meu lar fora de casa, por estar

sempre comigo. Também à sua família, por me acolher e por todos os momentos compartilhados.

A Aricelma França, a Celminha/“Celmãezinha”, nossa mãe paulista! Obrigada por todo amor, pelos sorrisos diários e risadas até chorar, pelos conselhos, colo, conversas, passeios...sua paciência e carinho tornaram essa caminhada mais leve. Agradeço por todo o conhecimento transmitido da maneira mais doce do mundo! Você é um exemplo para mim!

A Prof. Dra. Mayra Elena Ortiz D' Avila Assumpcao por me receber no laboratório de Fertilização *in vitro* e me acolher por mais de ano na grande família da reprodução. Admiro a união de vocês e agradeço imensamente por tudo o que me ensinaram. Em especial, Adriano, Camila, Leticia, Luana, Fernando, Robinson e Tais.

Ao Adriano Siqueira, não tenho palavras para te agradecer ou para mencionar tudo o que você me ensinou. Obrigada por ter se tornado um amigo e por sempre me tratar da melhor maneira possível, me introduzindo no mundo da reprodução animal. Agradeço pela paciência e confiança ao me ensinar, por sempre me explicar pacientemente e descontraidamente todas as coisas, além de muitas vezes confiar meu auxilio em coisas do seu trabalho. Geramos muitos “filhos” juntos. Você é parte essencial desse trabalho. Aprendi muito com você!

A Prof. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli, por abrir as portas do laboratório de microscopia confocal e por seu auxilio e disponibilidade todas as vezes que precisei.

Ao Adam Arai, uma pessoa maravilhosa que esse trabalho me permitiu conhecer. É muito bom ter, além da sua colaboração, a sua amizade. Obrigada pelos almoços, cafés e conversas tarde afora. Seu jeito único de ser alegrou meus dias e deixaram esse trabalho lindo, graças a sua atenção, cuidado e perfeccionismo.

A todos do Laboratório de Micoplasmas, nossa família e amizade aliviam o peso da distância de casa e a carga das longas horas de trabalho. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e pelo companheirismo. Especialmente agradeço a Guilherme e Maysa, companheiros de vida, estudo e de bancada.

A Verena e Aline pela acolhida, ensinamentos e amizade. Esse mestrado tem o dedo de vocês, desde a aprovação. A Ana Márcia, Cristina, Natalia e Regis

por toda a contribuição e ensino dos aspectos veterinários. Pela ajuda impagável nas minhas coletas e transporte dos meus “filhotes” até o laboratório.

Ao Projeto Micro, do Laboratório de Microbiologia do IMS/CAT UFBA, onde tudo começou. Por manterem as portas sempre abertas e pela disponibilidade em ajudar. Especialmente ao Manoel, por dividir os experimentos e a bancada e por toda a ajuda nesse trabalho.

Aos meus amigos de Araçuaí, especialmente Bebeto, Bolinha, William, Tatiara, Gabriel, Marcola, Maíra, Belsinha, e todos os outros. Pela força de sempre, por torcerem por mim e por fazerem os nossos reencontros sempre maravilhosos e intensos o suficiente para compensar a minha ausência. Por me fazerem sentir querida, mesmo estando longe.

As minhas biotecs lindas, Bel, Cathe e Rebeca, pela amizade sincera e pelos risos mesmo a distância. Sou muito feliz por ter vocês!

Às amigas Gisele, Caciara, Naide e Isabel das secretarias do Departamento de microbiologia. Obrigada pela amizade, por serem tão prestativas e atenciosas. Por me aturarem sempre com um sorriso todas as vezes que repetidamente apareci precisando de alguma ajuda e por serem tão solicitas da maneira mais descontraída possível. Obrigada pelo cuidado e risadas!

A todos os funcionários da limpeza e portaria, por tornarem o ambiente de trabalho mais seguro e organizado, além de todos os sorrisos e preocupação aos fins de semana ou ao sair muito tarde.

Aos familiares e aos amigos que, de perto ou de longe, me acompanharam nessa jornada tornando essa caminhada mais leve e pelos momentos renovadores.

Quem caminha devagar pode até ir mais rápido, mas quem caminha acompanhado vai mais longe!

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.”

São Tomás de Aquino

RESUMO

REZENDE, I. S. **Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a *Ureaplasma diversum.*** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A infertilidade nos rebanhos, um distúrbio reprodutivo múltiplo, pode ser causada por micoplasmas e ureaplasmas, levando a prejuízos ao setor agro-industrial. *Ureaplasma diversum* pode causar infecções e ativar a resposta imune inata, de células fagocitárias e produção de citocinas. Em consequência ocorre a ativação de TLR's (Toll Like Receptors) e inflamassomas que provocam a maturação de citocinas pró-inflamatórias. Devido à importância dos macrófagos na proteção contra essas infecções e a relação direta com os blastocistos bovinos, o presente estudo teve o objetivo avaliar o perfil imune *in vitro* destas células após a infecção experimental por *Ureaplasma diversum.* Macrófagos murinos e bovinos e blastocistos bovinos foram previamente cultivados e infectados por *U. diversum* (ATCC 49782 e um isolado clínico) por 24 horas. Macrófagos murinos e blastocistos bovinos foram infectados apenas com o micro-organismo viável e com apenas uma concentração. Macrófagos bovinos foram infectados com diferentes concentrações (CCU) do micro-organismo, estando viáveis ou inativados por calor (100°C por 30 minutos). O sobrenadante da cultura de macrófagos murinos foi coletado para dosagem de citocinas pelo ensaio imunoenzimático ELISA. As células J774 foram analisadas quanto à expressão gênica de Toll-like Receptors (TLR) usando qPCR e para a expressão gênica de vias de inflamossoma por qPCR *array*. Em macrófagos e blastocistos bovinos, os marcadores imunológicos após a infecção por *U. diversum* foram avaliados por qPCR *assay* e o nitrito foi dosado pelo método de Griess. A internalização dos micro-organismos nos blastocistos foi confirmada por microscopia confocal. Observou-se elevada produção de citocinas pró-inflamatórias em todas as células testadas e houve indução da secreção de nitrito, exceto nos blastocistos. TLR2 demonstrou-se mais expresso que os demais, como os genes importantes para a cascata inflamatória como quimiocinas, IL-6 e NF-κB. Foi observado que *U. diversum* é capaz de promover resposta inflamatória em macrófagos murinos, macrófagos e blastocistos bovinos. O mecanismo ativador ainda não está claro, mas esses resultados demonstram o envolvimento da ativação do TLR2 e a secreção de IL-1β e TNF-α. A ativação inflamatória pode estar relacionada com a presença de um componente celular de superfície capaz de induzir uma resposta desse tipo. *Mollicutes* possuem grande número de lipoproteínas denominadas de proteínas associadas aos lipídeos de membrana (LAMP's). No entanto, as lipoproteínas de *Ureaplasma diversum* ainda não foram totalmente caracterizadas. Os resultados deste estudo, associados ao recente sequenciamento do genoma de *Ureaplasma diversum*, permite avanço na compreensão da biologia molecular de infecções por micoplasma. Assim, fomenta-se a discussão da importância e relevância das micoplasmoses, especialmente por *U. diversum*, na reprodução e bovinocultura no cenário brasileiro.

Palavras-chave: *Ureaplasma diversum*. Imunogenicidade. Macrófagos. Blastocistos bovinos.

ABSTRACT

REZENDE, I. S. **Response of macrophages and bovine blastocysts after exposure to *Ureaplasma diversum.*** 2016. 82 p. Dissertation (Masther thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Infertility in cattle, a multiple reproductive disorder can be caused by mycoplasmas and ureaplasmas, causing losses in the agro-industrial sector. *Ureaplasma diversum* can lead to an infection and activate the innate immune response of phagocytic cells and cytokine production. Consequently occurs's the activation of Toll-Like Receptors (TLR's) and inflammasomes, which trigger the maturation of proinflammatory cytokines. Due to the importance of macrophages in the protection against these infections and the direct relationship with the bovine blastocysts, this study aims to evaluate an *in vitro* immune profile expressed by these cells after experimental infection with *Ureaplasma diversum*. Murine and bovine macrophages and bovine blastocysts were previously cultured and infected with two *Ureaplasma diversum* (ATCC 49782 and clinical strain) for 24 hours. Murine macrophages and bovine blastocysts were infected only with viable micro-organism and with an only concentration. Bovine macrophages were infected with different concentrations (CCU) of microorganisms and viable or heat-inactivated (100°C for 30 minutes). The supernatant of culture of murine macrophages were used for cytokine assay by ELISA. The cells J774 were analyzed for Toll-like receptor (TLR) gene expression using qPCR and for inflammasome pathway genes expression using qPCR and gene expression inflammasome pathways by qPCR *array*. In macrophage and bovine blastocysts, immunologic markers after infection by *U. diversum* were assessed by qPCR array and qPCR assay and nitrite was evaluate by Griess method. The internalisation of microorganisms in bovine blastocysts was confirmed by confocal microscopy. There was a high production of proinflammatory cytokines and induction of nitrite secretion except in blastocysts. TLR2 was more expressive than other TLR's, as well as another important genes to inflammatory cascade such as chemokines, IL6 and NF-κB genes. It was observed that *U. diversum* is capable of promoting the inflammatory response in murine and bovine macrophages and bovine blastocysts. The trigger mechanism is not clear, but these results demonstrate the involvement of TLR2 activation and secretion of IL-1β and TNF-α. The inflammatory activation may be related to the presence of a cell surface component capable of inducing a response of that type. *Mollicutes* possess a large number of lipoproteins termed lipid-associated membrane proteins (LAMPs). However, *Ureaplasma diversum* lipoproteins have not yet completely been characterized. The results of this study, associated with the recent sequencing of the *U. diversum* genome, allows advance in understanding the molecular biology of mycoplasma infections. Thus encourages the discussion of the importance and relevance of mycoplasmosis, especially *U. diversum*, reproduction and cattle in the Brazilian scene.

Keywords: *Ureaplasma diversum*. Inmunogenicidad. Macrophages. Bovine blastocysts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem de crescimento anual do número de cabeças de bovinos no Brasil entre os anos 2005 a 2014. 18
Figura 2 - Localização de *M. bovis* e *M. bovigenitalium* em embriões bovinos 27
Figura 3 - Microscopia eletrônica de células de *U. diversum* 28
Figura 4 - Microscopia eletrônica evidenciando a presença e aderência de células de *U. diversum* na superfície da zona pelúcida de embriões bovinos. 29
Figura 5 - Quantificação de citocinas do sobrenadante da cultura de macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas por *U. diversum* ATCC 49782. 43
Figura 6 - Quantificação de citocinas do sobrenadante da cultura de macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas pelas cepas de referência e isolado clínico de *U. diversum*..... 44
Figura 7 - Expressão gênica de TLR's em macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*. 46
Figura 8 - Expressão gênica de vias ativação de inflamossoma em macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*. 47
Figura 9 - Quantificação de nitrito do sobrenadante da cultura de macrófagos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *Ureaplasma diversum*. 49
Figura 10 - Expressão gênica de citocinas e TLR's em macrófagos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*, viáveis e inativados. 50
Figura 11 - Expressão gênica de citocinas e TLR's em macrófagos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas com diferentes inóculos da cepa de referência e do isolado clínico de *U. diversum*. 51
Figura 12 - Projeção ortogonal da microscopia confocal evidenciando a internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos após 24 horas de infecção exerimental por *U. diversum*..... 53
Figura 13 - Microscopia confocal evidenciando a internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos após 24 horas de infecção experimental. 54

Figura 14 - Quantificação de nitrito do sobrenadante da cultura de blastocistos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*. 55
Figura 15 - Expressão gênica de citocinas e TLR's em blastocistos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas com diferentes inóculos da cepa de referência e do isolado clínico de *U. diversum*. 56
Figura 16 - Representação hipotética da influência de *U. diversum* na implantação embrionária e falha na gestação. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

µL - Microlitro

µg – Micrograma

C - Citosina

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

cDNA – *Complementar Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfatado

FAO - *Food and Agriculture Organization of The United Nations*

G – Guanina

Kpb - Quilo pares de bases

UB – Ureaplasma broth

LPP - Lipoproteína

M - Molar

NaCl - Cloreto de Sódio

ng - Nanograma

nm - Nanomêtros

OIE - *World Organization for Animal Health*

PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salina)

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

RPM - Rotações por minuto

CCU – *Color Changing Unit*

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (células mononucleares do sangue periférico)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **18**
1.1 Bovinocultura **18**
1.2 Características gerais dos *Mollicutes* **19**
1.3 Virulência dos micoplasmas **21**
1.3.1 Adesão 21
1.3.2 Invasão 22
1.3.3 Variação antigênica 23
1.3.4 Lipoproteínas 24
1.3.5 Superantígenos 25
1.4 Micoplasmoses na reprodução bovina **25**
1.4.1 *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma bovigenitalium* 26
1.4.2 *Ureaplasma diversum* 27
1.5 Diagnóstico de micoplasmas de interesse veterinário **31**
1.6 Tratamento e controle de micoplasmas de interesse veterinário **31**
2 OBJETIVOS **33**
2.1 Objetivos Gerais **33**
2.2 Objetivos específicos **33**
3 MATERIAIS E MÉTODOS **34**
3.1 Micro-organismos **34**
3.2 Inóculo de *U. diversum* **34**
3.3 Infecção de macrófagos murinos J774 ..... **35**
3.3.1 Dosagem de citocinas 35
3.3.2 Expressão gênica de TLR's e vias de inflamossoma 35
3.4 Infecção de macrófagos bovinos **36**
3.4.1 Coleta e seleção de macrófagos bovinos 36
3.4.2 Infecção de PBMC com *Ureaplasma diversum* 36
3.4.3 Dosagem de nitrito 37
3.4.4 Expressão gênica de Toll Like Receptors e citocinas em macrófagos bovinos infectados com *U diversum* 37
3.5 Infecção de blastocistos bovinos **38**
3.5.1 Fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário 38
3.5.2 Marcação de ureaplasmas com fluoresceína 40
3.5.3 Infecção dos blastocistos com *Ureaplasma diversum* 40

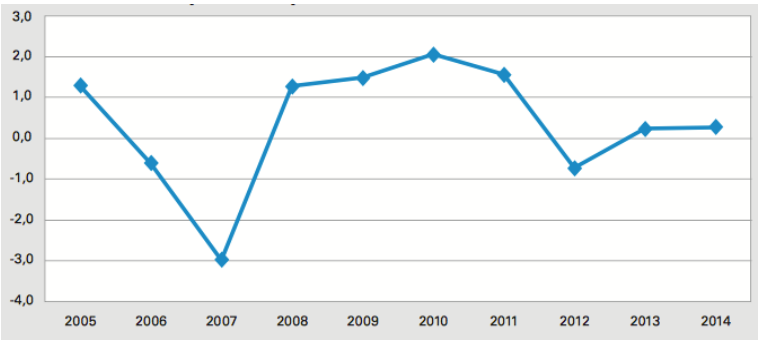
3.5.4 Microscopia confocal 41
3.5.5 Dosagem de nitrito 41
3.5.6 Extração de RNA e produção de cDNA 41
3.5.7 Expressão gênica de marcadores inflamatórios 42
3.6 Análise estatística 42
4 RESULTADOS 43
4.1 Infecção de macrófagos murinos (J774) com *Ureaplasma diversum* 43
4.1.1 Análise da produção de citocinas 43
4.1.2 Expressão gênica de *Toll Like Receptors* (TLR's) e vias de ativação de inflamossoma 44
4.2 Infecção de macrófagos bovinos por *Ureaplasma diversum* 48
4.2.1 Dosagem de nitrito 48
4.2.2 Expressão gênica de citocinas e Toll Like Receptors (TLR's) 50
4.3 Infecção de blastocistos bovinos com *U.diversum* 52
4.3.1 Microscopia confocal 52
4.3.2 Dosagem de nitrito 55
4.3.3 Expressão gênica de citocinas e Toll Like Receptors (TLR's) 55
5 DISCUSSÃO 57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 66
REFERÊNCIAS* 67
APÊNDICES 79
APÊNDICE A - Genes sobre-expressos de vias de inflamossoma após a infecção com as amostras GOTA e ATCC 49782 em comparação ao controle (apenas células) 79
APÊNDICE B - Genes sub-expressos de vias de inflamossoma após a infecção com as amostras GOTA e ATCC 49782 em comparação ao controle (apenas células) 80
APÊNDICE C - Genes avaliados pelo kit Mouse Inflammasomes RT² Profiler™ qPCR *Array* 81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bovinocultura

A agro-indústria no Brasil é importante e participativa no âmbito social e na melhoria de qualidade de vida da população. Além da intensa movimentação econômica, geram-se empregos na produção animal e industrial. A criação de gado no Brasil tem destaque no agronegócio internacional, pois o país possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo e é o primeiro país nas exportações de gado (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013). A Figura 1 apresenta a variação anual do efetivo de bovinos de 2005 a 2014 (IBGE, 2015).

Figura 1 – Porcentagem de crescimento anual do número de cabeças de bovinos no Brasil entre os anos 2005 a 2014.



Fonte: Banco de dados do IBGE (IBGE, 2014).

A bovinocultura brasileira proporciona o desenvolvimento de dois principais segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite. Para a economia brasileira representam o valor bruto estimado em R$ 67 bilhões e os animais estão em todos os estados brasileiros (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013). Os processos da produção animal incluem: controles adequados de doenças infecciosas e parasitárias, boas práticas de nutrição, cruzamentos e manejo geral. Entre os diversos distúrbios ocorre tendência a parição prematura, infertilidade, natimortos ou abortamentos (BROMFIELD et al., 2015; POTTER et al., 2010; SHELDON, 2015).

Fatores de risco para a infecção do aparelho reprodutivo estão o manejo pré-parto inadequado, distúrbios endócrinos e nutricionais, condições sanitárias

precárias, infecções pós-parição (ANDRADE, et al., 2005). Incluem-se fatores ambientais de estresse, especialmente o térmico (FERREIRA; FERNANDES, 2000; WAKAYO; BRAR; PRABHAKAR, 2015) ou de exposição a micro-organismos potencialmente patogênicos adquiridos principalmente durante a estação de monta (BROMFIELD et al., 2015; GAMBARINI et al., 2009; POTTER et al., 2010; SHELDON, 2015).

As doenças infecciosas atingem muitos animais em pouco tempo e o trato genital de bovinos é mais frequentemente atingido. Esta situação se caracteriza por baixas taxas de natalidade e mortalidade. A natalidade do rebanho é influenciada pela taxa de concepção, índice de mortalidade embrionária e abortamento. Nas perdas produtivas devido aos baixos índices reprodutivos de animais por doenças infecciosas, as micoplasmoses têm impacto neste contexto pouco conhecido (BROMFIELD et al., 2015; ENTRICAN, 2002; HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004; MILLER et al., 1994; POTTER et al., 2010; SHELDON, 2015).

A mastite, vulvovaginite e endometrite são distúrbios que direta ou indiretamente refletem na eficiência reprodutiva. Estas enfermidades são geralmente de transmissão horizontal, mas podem estar associadas a deficiências ou manejo como hábitos higiênicos inadequados e modo de tratar os animais. Adicionalmente temos a higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha, as condições do local onde os animais permanecem e circulam, a existência de patógenos importantes, lesões prévias nos tetos, água de lavagem dos equipamentos e preparo de soluções de limpeza e desinfecção. (DEL FAVA et al., 2003; ESPOSITO et al., 2014). O aborto pode ocorrer pela infecção por protozoários (*Neospora caninum)* (HORCAJO et al, 2016), fungos (*Aspergillus fumigatus*), vírus (vírus da diarreia viral bovina (LANYON et al., 2014), herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)) e bactérias como *Brucella sp.* (DORNELES; SRIRANGANATHAN; LAGE, 2015)*, Leptospira sp., Pasteurella spp., Salmonella spp., Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Corynebacterium pseudotuberculosis, Yersinia pseudotuberculosis, Mycoplasma spp., E .coli* (ANTONIASSI et al., 2007; SHELDON et al., 2014).

1.2 Características gerais dos *Mollicutes*

A classe *Mollicutes* possui cerca de 200 espécies distribuídas pelas ordens *Entomoplasmatales, Acholeplasmatales, Anaeroplasmatales* e *Mycoplasmatales*, a

qual é composta por duas famílias: *Mycoplasmataceae* e *Incertae sedis*. Os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* pertencem à família Mycoplasmatacaeae (BERGEY, 2010; RAZIN et al., 1998).

Mollicutes são considerados os menores organismos de vida livre, podendo apresentar-se como células pleomórficas de diâmetro de 300 a 800 nm. Possuem genomas reduzidos, com baixo conteúdo de %G+C (aproximadamente 30%), variando de 580 a 2200 Kpb e codificando cerca de 600 proteínas. Por serem pequenos geralmente não causam turvação de meios de cultura líquidos, provocando somente alteração no pH. Relacionam-se filogeneticamente às bactérias gram-positivas das quais evoluíram de forma degenerativa. Dentre suas principais características, não possuem parede celular sendo, portanto sobrevivem apenas em ambientes isotônicos e de antibióticos beta-lactâmicos. Suas polimerases são resistentes à rifampicina. Pela sua capacidade biossintética limitada e por serem nutricionalmente exigentes, devido à redução metabólica, exigem para seu crescimento a presença de aminoácidos, nucleotídeos, esteróis e ácidos graxos exógenos no meio de cultura. A deficiência na via respiratória do ciclo do ácido tricarboxílico reduz sua capacidade de fosforilação oxidativa. Para a produção de ATP, podem fermentar a glicose ou hidrolisar a arginina, reduzindo ou aumentando o pH do meio, respectivamente (BEAMAN; POLLACK, 1983; BERGEY, 2010; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Os ureaplasmas são o único entre os *Mollicutes* que requerem uréia para produzir ATP, hidrolizando este composto e produzindo amônia (BASEMAN; TULLY, 1997; RAZIN, 2004).

Os molicutes são ubíquos e distribuem-se entre animais, plantas e insetos incluindo-se o homem. Entre os animais são encontrados em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, com especificidade para cada grupo animal. A especificidade ao hospedeiro e ao sítio anatômico ocorre pelas necessidades nutricionais variadas. No entanto tem-se demonstrado a capacidade de adaptação a hospedeiros não habituais pela sua capacidade de mutação. Normalmente são transmitidos por contato ou aerossóis entre os hospedeiros. Infectam principalmente as superfícies de mucosas, principalmente no trato respiratório, urogenital e reprodutivo, sistema nervoso, olhos, glândulas mamárias e articulações (BUZINHANI et al., 2007; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Eventual baixa resposta imune ou alterações fisiológicas do hospedeiro, favorecem a infecção e colonização destas bactérias (PITCHER; NICHOLAS, 2005). São considerados micro-organismos

oportunistas por excelência, mas podem ser agentes primários de infecções de caráter agudo ou crônico. A doença crônica é a mais frequente (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994; RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Embora os micoplasmas cresçam em meios acelulares, a preferência por células ocorre pela facilidade de obtenção de nutrientes essenciais. (BUZINHANI; METIFFOGO; TIMENETSKY, 2007). Para garantir sua sobrevivência com o genoma reduzido nos nichos estudados, supõe-se que estas bactérias vivem em constante mutação (DAVID et al., 2002; DYBVIG; VOELKER, 1996). Os componentes da membrana citoplasmática de algumas espécies estudadas modulam a resposta imune principalmente no que se refere às citocinas. A diversidade das características destas bactérias e células dos hospedeiros, associados ou não, interferem no desenvolvimento das micoplasmoses (ROTTEM, 2003).

.

1.3 Virulência dos micoplasmas

A virulência dos micoplasmas tem sido determinada por algumas das suas características biológicas. A exemplo, tem-se a indução de estresse oxidativo e dano à membrana da célula hospedeira pela geração de peróxido de hidrogênio e radicais superóxido por micoplasmas aderentes; interferência no metabolismo e função celular pela competição por nutrientes; imunomodulação devido à presença de glicocálix ou estruturas eletrodensas na superfície da bactéria; modificação da resposta imune do hospedeiro pela alta frequência de variação de fase e consequente diversidade antigênica na superfície bacteriana. Incluem-se as aberrações cromossômicas na célula hospedeira pela secreção de enzimas fosfolipases, ATPases, hemolisinas, proteases e nucleases; escape da ação de antibióticos e resposta imune pela intracelularidade, favorecendo a cronicidade das doenças (CHANG et al., 2011).

1.3.1 Adesão

Apesar de serem ainda pouco conhecidos, sabe-se que os fatores de virulência dos *Mollicutes* são importantes para sua sobrevivência, colonização e desenvolvimento de doença. A aderência à célula hospedeira indica que este contato íntimo é um fator primordial (ROSENGARTEN, 2000). Assim podem

competir pelos nutrientes essenciais para seu crescimento e colonização com as células hospedeiras e outros micro-organismos. Pelo genoma reduzido e consequente redução metabólica precisam obter do nicho os precursores de lipídeos, pirimidinas e purinas pré-formadas. São também chamados de “parasitas ideais”, pois raramente levam seu hospedeiro à morte (RAZIN; HAYFLICK, 2010; RAZIN, 1999).

As adesinas na sua membrana interagem com receptores específicos da célula hospedeira permitindo as vezes até a fusão com a membrana da célula hospedeira. Em *M. fermentans,* a fusão é dependente do conteúdo de colesterol da membrana dos micoplasmas possibilitando a troca adequada de nutrientes (ROTTEM, 2002). Neste processo, verificou-se ainda a produção de proteases, fosfolipases e nuclease, além da presença de radicais superóxido (RAZIN et al., 1998).

Os mecanismos de aderência de *M. pneumoniae*, agente da pneumonia atípica primaria em humanos, estão entre as espécies melhor estudadas. Esta espécie, como *M. genitallium*, agente da uretrite não gonocóccica humana, possuem uma “organela de adesão”, que se caracteriza como uma extensão polar, constituída por adesinas e proteínas acessórias promotoras de motilidade por deslizamento, além da adesão (ROTTEM, 2003). O processo de aderência tem sido relacionado à dificuldade de eliminação destes micro-organismos por secreções das mucosas ou urina (RAZIN et al., 1998).

Em algumas espécies de micoplasmas, sem a estrutura polar, mas com diferentes lipoproteínas são descritas como atuantes no processo de adesão. (adesinas). Estudos demonstraram tal papel em *M. hominis* (BOESEN et al., 2001)*, M. synoviae* (KHIARI; MARDASSI, 2012)*, M. conjuntivae* (BELLOY et al., 2003) e *M. hyorhinis* (XIONG et al., 2016)*.* As cepas mutantes deficientes em aderência são avirulentas, apesar de estas possuírem potencial imunogênico (BASEMAN; TULLY, 1997; RAZIN; JACOBS, 1992; ROMERO-ARROYO et al., 1999; SVENSTRUP et al., 2002).

1.3.2 Invasão

A invasão celular por micoplasmas em células fagocíticas iniciou-se com a descoberta de *M. penetrans* em pacientes HIV+. Posteriormente, verificou-se que

este micoplasmas era outro oportunista em humanos. Atualmente a invasão é conhecida com outras espécies envolvendo células não fagocíticas após processo de adesão. A localização intracelular permite melhor acesso aos nutrientes, além da proteção contra a resposta imune e ação de antibióticos. Este achado poderia explicar o caráter crônico das infecções por micoplasmas (BÜRKI; FREY; PILO, 2015). A intracelularidade foi demonstrada em *M. penetrans, M. fermentans, M. bovis, M. pneumoniae, M. agalactiae, M. genitalium* e *M. gallisepticum* (BURKI et al., 2015; HEDGE et al., 2015; ROTTEM, 2003).

Em geral, o processo de invasão celular envolve mecanismos complexos e ainda pouco conhecidos, tanto das bactérias quanto das células hospedeiras. A associação entre adesinas e receptores celulares promove a interação necessária. O processo de adesão nos molicutes, apesar de insuficiente para desendear os eventos de invasão, é uma etapa essencial. A aderência a fibronectina ou aos polissacarídeos e a capacidade de ligação ao plasminogênio das células hospedeiras foram considerados compostos responsáveis para a invasão de *M. penetrans* e *M. fermentans,* respectivamente (ROTTEM, 2003; YAVLOVICH et al., 2001; YAVLOVICH et al., 2004). Se o ambiente intracelular for o ideal para a espécie, os micoplasmas podem ali sobreviver por um longo tempo; caso contrário, são degradadas pela formação do fagolisossoma. Os micro-organismos invasores podem persistir e multiplicar no interior do citoplasma. *M. penetrans* foi observado sobrevivendo e multiplicando-se no interior de vesículas intracelulares (ROTTEM, 2003).

1.3.3 Variação antigênica

Sem parede celular, os compostos da membrana celular dos micoplasmas expostos nos nichos de hospedeiros, são importantes na relação patógeno-hospedeiro. Verificou-se que algumas espécies apresentavam grande variação antigênica nesta estrutura mediados pela recombinação de sítios-específicos ou mutações de alta frequência no genoma. Assim, esta propriedade também contribui para a sobrevivência e adaptação ao ambiente intracelular e o consequente escape do sistema imune do hospedeiro (CITTI; BLANCHARD, 2013; RAZIN; HAYFLICK, 2010; RAZIN et al., 1998).

Em *M. bovis* verificou-se a variação antigênica entre subclones de uma mesma cepa. Esta variabilidade foi justificada com base em diferentes proteínas anfifílicas proeminentes, integrais de membrana, contendo epítopos de reação cruzada que atuam como principais imunógenos (BURKI et al., 2015).

1.3.4 Lipoproteínas

As lipoproteínas de membrana citoplasmática de micoplasmas representam aproximadamente 70% da massa da membrana com importância na sua antigenicidade (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; YOU; ZENG; WU, 2006). Possuem um resíduo cisteinil amino-terminal, podendo ser N-acilado em algumas espécies (ZUO et al., 2009). A maioria das lipoproteínas de micoplasmas é exposta ao meio extracelular com o grupamento acil ancorado à membrana citoplasmática. Funcionalmente, acredita-se que atuam como proteínas periplasmáticas de bactérias gram-negativas, como fator de virulência, como alvo para anticorpos inibidores de crescimento ou como imunomodulinas (BROWNING et al, 2011; ROSENGARTEN, 2000).

Os genes codificadores de lipoproteínas parecem estar no mesmo operon de transportadores ABC, levando à hipótese também estarem relacionados ao transporte de nutrientes. Este operon é conservado entre muitos micoplasmas patogênicos, demonstrando que, possivelmente, codifiquem um sistema de transporte de nucleotídeos essencial para o crescimento *in vivo* e virulência (BROWNING et al, 2011).

A exemplo, a *OppA* de *M. hominis*, caracterizada como oligopeptídeo com função de citoaderência e ATPase, indutor de apoptose. Em *M. hyopneumoniae* uma lipoproteína no mesmo operon foi caracterizada como exonuclease. Em *M. gallisepticum e Mycoplasma mycoides subspecie mycoides small colony* também foram encontradas lipoproteínas localizadas no mesmo operon. Também são descritas as lipoproteínas Vsps de *M. bovis* e Mvsps de *M. móbile* (BROWNING et al, 2011; ROSENGARTEN, 2000; WU et al., 2012; ZUO et al., 2009).

1.3.5 Superantígenos

Superantígenos são potentes toxinas imunoestimulatórias produzidas por patógenos bacterianos ou virais (DIEDERSHAGEN et al., 2007). São proteínas reguladoras que induzem a proliferação de células do sistema imune (principalmente células T), por mecanismos distintos dos antígenos convencioanis, provocam a secreção intensa de várias citocinas, *in vitro* e *in vivo.* A resposta contribui com os marcadores inflamatórios que caracterizam as implicações patogênicas de uma doença (ROTTEM, 2003; SHIO et al., 2014).

M. arthritidis produz o superantígeno MAM melhor estudado. Em comparação a outros superantígenos de outras bactérias, este possui baixa ou nenhuma homologia a outras toxinas, mas possui a mesma capacidade de estimular a secreção de citocinas. Nesta espécie de micoplasma o superantígeno MAM demonstrou atividade de DNAse. Em micoplasmas a ação de endonuclease é importante para degradar o material genético do hospedeiro para utilização dos precursores de ácidos nucleicos (ATAEE et al., 2015; DIEDERSHAGEN et al., 2007).

1.4 Micoplasmoses na reprodução bovina

A patogênese da micoplasmose genital é pouco compreendida, mas é provável que envolva a ativação de macrófagos e outras células do sistema imunológico na interface materno-fetal. Alguns estudos caracterizam inicialmente os fatores de virulência de algumas espécies e que podem explicar como um organismo, que carece de LPS, estimula a produção de citocinas associadas com parto prematuro. Dada a forte associação da inflamação com o nascimento prematuro, a resposta imune poderia fornecer um alvo eficaz na prevenção da prematuridade causada por este organismo (PELTIER et al, 2007).

Várias são as infecções promovidas pelos micoplasmas, porém especificamente a vulvovaginite bovina foi descrita por diversos autores (AMARAL, 2003; BEY, 2006; DOIG, et al, 1979; LYSNYANSKY et al., 2009), caracterizada de inflamação por hiperemia, nódulos de 1 a 2 mm , coloração cinza , marrom ou vermelha na mucosa vaginal, os quais podem persistir por vários dias. Esta inflamação resulta no aparecimento súbito de descarga vulvar, granulações na

mucosa vaginal associada ou não com a presença de vesículas na vulva, em fêmeas na fase reprodutiva (GAMBARINI et al., 2009).

Estudos sobre a ocorrência da vulvovaginite em rebanho brasileiro demonstraram que em 57,15% dos casos o diagnóstico foi positivo para *Mycoplasma spp,* valores estes, superiores aos descritos em outros países. Dentre os positivos, houve casos em que a vulvovaginite foi discreta, porém com histórico de aborto, contribuindo no questionamento sobre o envolvimento do *Mycoplasma spp* nas patologias reprodutivas bovinas (NASCIMENTO et al., 2005). Oliveira-Filho et al (2005) ressaltam a importância da avaliação de lesões na mucosa vulvo-vaginal especialmente em animais pertencentes aos sistemas intensivos de produção leiteira, uma vez que a sua principal via de transmissão é a venérea.

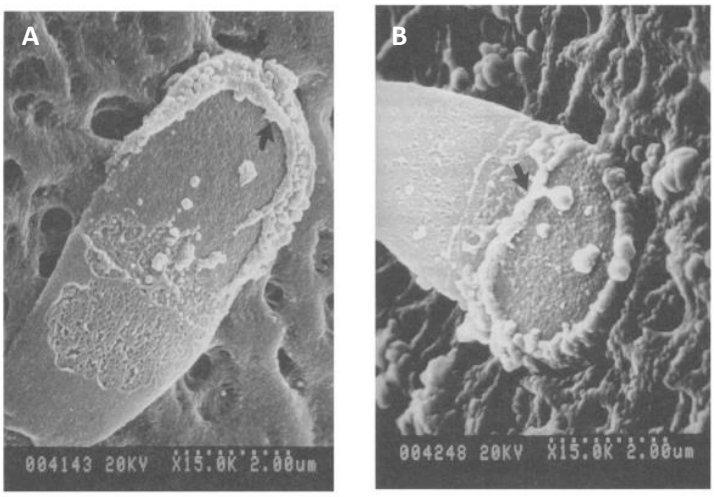
Entre as espécies de micoplasmas isoladas de bovinos, o *M. bovis, M. bovigenitalium* e *U. diversum* são considerados de maior importância para as infecções do trato urogenital (BUZINHANI et al., 2007; LYSNYANSKY et al., 2009; STRINGFELLOW; GIVENS, 2000).

1.4.1 *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma bovigenitalium*

Mycoplasma bovis e *M. bovigenitalium* tem sido associados com infertilidade e falhas reprodutivas em bovinos. Ambos foram isolados a partir de sêmen e são transmitidos por acasalamento natural e pela inseminação artificial (BIELANSKI; DEVENISH; PHIPPS-TODD, 1999). Ambos micoplasmas foram recuperados da superfície da zona pelúcida associado à célula espermática (Figura 2) e de embriões bovinos intactos, lavados ou tratados com antibióticos (BIELANSKI; DEVENISH; PHIPPS-TODD, 1999; BIELANSKI et al., 1989).

M. bovis é altamente adaptado aos bovinos, porém foi isolado de outros ruminantes e humanos. A mastite bovina por *Mycoplasma spp* indica ser uma patologia emergente e as perdas devido a esta infecção por *M. bovis* podem ser mais frequentes do que as doenças respiratórias (FOX et al., 2003; NICHOLAS; AYLING, 2003). *Mycoplasma bovis* também causa endometrite, salpingite, ooforite, artrite, abortamento e vesiculite seminal. Em novilhas inseminadas com sêmen contaminado pelo agente foram observados episódios de repetição de cio (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

Figura 2 - Localização de *M. bovis* e *M. bovigenitalium* em embriões bovinos



Legenda: Microscopia eletrônica evidenciando a presença e aderência de *Mycoplasma bovis* (A) e *Mycoplasma bovigenitalium* (B) na região acrossomal de uma célula espermática na zona pelúcida de embrião bovino. Seta indica a localização do *M. bovis* (A) e *M. bovigenitalium* (B). Barra: 2 µm.
Fonte: Adaptado de Bielanski; Devenish; Phipps-Todd (1999).

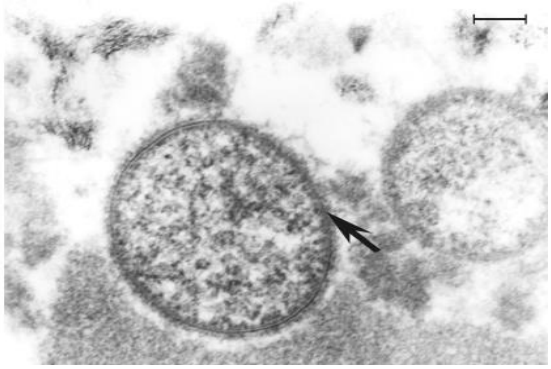
Considera-se *M. bovigenitalium* como o agente primário da vulvovaginite (DOIG et al., 1979) mas também causador de infertilidade, endometrite necrotizante, vesiculite seminal e diminuição da motilidade espermática (NICHOLAS et al., 2006; RUHNKE; ROSENDAL, 1994). As infecções genitais causadas pelo agente em fêmeas são caracterizadas por vulvovaginite granular, com descarga vaginal mucopurulenta, apresentando ou não infertilidade. Mastite e abortamento também são relatados (EAGLESOME et al., 1992; GONZÁLEZ; WILSON, 2003).

1.4.2 *Ureaplasma diversum*

Ureaplasmas também pertencem aos *Mollicutes* e apesar de não possuírem parede celular, apresentam cápsula polissacarídica sobre a membrana celular (Figura 3). Os ureaplasmas requerem a ureia para crescerem, pois têm a urease para hidrolizá-la produzindo amônia. O crescimento ideal ocorre a 37°C e pH entre 5,5-6,0, sendo que o pH acima de 7,5 inibe seu crescimento. Estas bactérias podem aderir a células epiteliais, competir com nutrientes, interagir com células principalmente pelas proteínas de membrana, e liberar compostos metabólicos. Alguns ureaplasmas infectam animais e outros, o homem (BUZINHANI,

METIFFOGO; TIMENETSKY, 2007; CHELMONSKA-SOYTA et al, 1994; MARQUES, 2009; MARQUES, 2010).

Figura 3 - Microscopia eletrônica de células de *U. diversum*

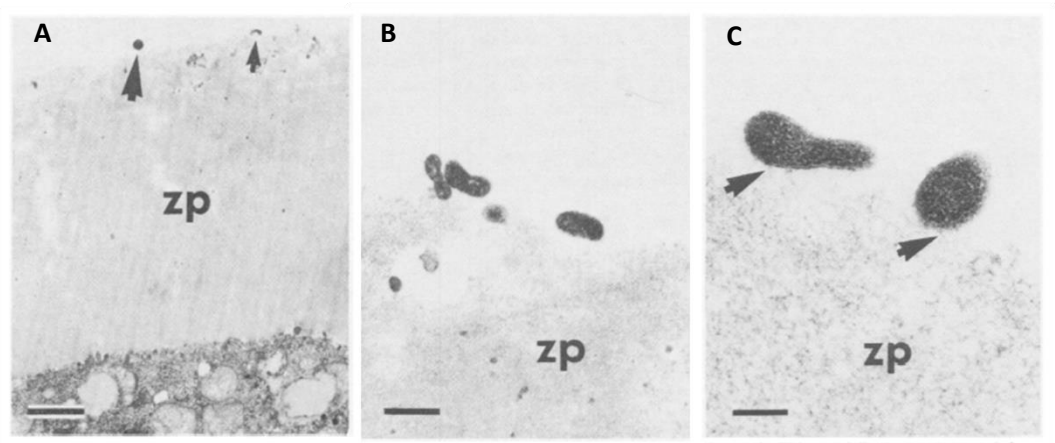


Legenda: Microscopia eletrônica de células de *U. diversum*, obtidas no cultivo de isolados provenientes de mucovulvovaginal e sêmen bovino, tratadas com vermelho de ruteno, evidenciando material polissacarídico. Seta preta indica material capsular. Barra 100 nm.
Fonte: Adaptado de Marques (2010).

U. diversum é também um molicute importante na pecuária colonizando o trato respiratório e reprodutivo de bovinos. Podem estar associados em patogenias como vulvite granular, endometrite, salpingite, vesiculite seminal, alveolite fetal, infertilidade e aborto (BUZINHANI; METTIFOGO; TIMENETSKY, 2007; CARDOSO et al., 2000; CHELMONSKA-SOYTA et al, 1994; MARQUES et al., 2010; MARQUES et al., 2013). A localização na superfície de embriões bovinos também foi demonstrada (BRITTON et al., 1987; BRITTON et al., 1989).

Seu revestimento capsular consiste em camada polissacarídica de 11 a 17 nm constituída de arabinose, xilose, manose, galactose e glucose (MARQUES et al., 2016). O sequenciamento recente do genoma de *U. diversum* (MARQUES et al., 2015) e as análises e testes posteriores (MARQUES et al., 2016) revelaram características importantes. As vias metabólicas correspondem às mesmas encontradas em ureaplasmas humanos, como a via de síntese de ATP pela hidrólise da ureia. Em relação à patogenicidade, foram encontrados genes codificadores de um grande número de lipoproteínas e de variação antigênica, assim como das enzimas urease, hemolisina, fosfolipase e glicosiltransferase (associado com a produção de cápsula).

Figura 4 - Microscopia eletrônica evidenciando a presença e aderência de células de *U. diversum* na superfície da zona pelúcida de embriões bovinos.



Legenda: Setas pretas indicam a localização de *U. diversum*. Barra (A) 2 µm, (B) 0,5 µm e (C) 0,2 µm.
Fonte: Adaptado de Britton et al. (1987).

Os estudos sobre a relação de *U. diversum* e os distúrbios reprodutivos foram considerados controversos um certo tempo, pois acreditava-se que estes micro-organismos eram comensais e não estavam relacionados com os problemas de infertilidade nos rebanhos. Posteriormente foi detectado em amostras de mucosas cervico-vaginal e sêmen de touros aparentemente sadios. No entanto no decorrer do tempo, o acúmulo de dados indicaram a relação patogênica deste ureaplasma e com fetos abortados e descargas vulvares anormais, sendo implicado também na ocorrência da vulvovaginite granular em rebanhos. O encontro frequente em fêmeas bovinas com histórico de aborto, este micro-organismo passou a ter importância na saúde animal. O aborto por *U. diversum* pode ser resultado da placentite e da penumonia fetal que ocorrem principalmente no último trimestre da prenhez (KUNDSIN et al., 1978; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Apesar do crescimento da importância de *U. diversum* em bovinos a sua relação permanece inconclusiva, pois pode ser encontrado em animais sem sintomas de alterações reprodutivas (MARQUES et al., 2011). Há ainda poucos dados sobre a aderência e internalização em células reprodutivas ou outras linhagens celulares bovinas, bem como informações conclusivas sobre o seu modo de ação durante as infecções. Estudos recentes demonstraram sua capacidade de invadir células Hep-2, induzir a apoptose (AMORIM et al., 2014), bem como

aumentar a produção de TNF-α no útero de camundongos experimentalmente infectados (SILVA et al., 2016).

Estudos demonstram que *U. diversum*, quando presente no sistema reprodutivo de vacas pode causar danos ao oócito, útero e epitélio do oviduto ou afetar o desenvolvimento do embrião, causando infertilidade ou falhas na gestação (DOIG et al., 1980). Este ureaplasma pode estar infectando e promovendo alterações morfológicas em espermatozóides de touros (BUZINHANI et al., 2011; HOBSON et al., 2013).

Atualmente, na bovinocultura, são utilizadas biotécnicas na reprodução como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* (PIV) de embriões. Os agentes infecciosos presentes no trato reprodutivo dos bovinos podem reduzir o número e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro,* ocasionar doenças nos animais receptores e nos neonatos (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000). De acordo com o Sub-comitê de Pesquisa da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (International Embryo Transfer Society–IETS), *U. diversum* é classificado na Categoria 4, que agrupa doenças para as quais ainda não são disponíveis dados suficientes para que haja uma conclusão sobre os riscos de transmissão ou ainda, doenças onde os riscos de transmissão via transferência de embriões não podem ser negligenciados (International Embryo Transfer Society, 1998).

Os componentes da membrana citoplasmática de alguns ureaplasmas modulam a resposta imune principalmente as citocinas. Estes fatores, associados ou não, interferem na integridade da célula hospedeira, de tecidos e órgãos, resultando em doença (BUZINHANI; METTIFOGO; TIMENETSKY, 2007; CARDOSO et al., 2000; CHELMONSKA-SOYTA et al, 1994; MARQUES et al., 2010; MARQUES et al., 2013). É relevante determinar a importância das citocinas envolvidas na pré-implantação do embrião e quando agem na infecção por *U. diversum*, uma vez que ambiente alterado pós-fertilização pode influenciar o desenvolvimento embrionário. A interferência no ambiente nutricional do blastocisto por agentes infecciosos é crucial para este contexto. Ureaplasmas estão dentre os micro-organismos que, *in vivo*, têm acesso ao colo do útero ou até mesmo ao embrião. Desta maneira podem causar a morte embrionária por alteração do ambiente materno ou através de danos diretos ao embrião (BRITTON et al., 1987; LEWANDOWSKA-SABAT et al., 2013).

1.5 Diagnóstico de micoplasmas de interesse veterinário

Apesar de crescerem em meio liquido, em meio sólido é possível obter o isolamento bacteriano. Sendo fastidiosos, o cultivo dos micoplasmas requer meios ricos específicos e suplementados com soro animal, ácidos nucleicos e cofatores de crescimento. O cultivo é demorado pela lenta multiplicação dos molicutes. Cuidados específicos na contaminação por outras bactérias de materiais clínicos são parcialmente controlados pela adição de impedientes como penicilina, acetato de tálio e antifúngicos que, nas respectivas concentrações, não prejudicam o cultivo, mesmo assim as contaminações são frequentes. A identificação, no entanto, é também muito limitada pela ausência comercial de soros específicos e as suas características fenotípicas são insuficientes na atualidade. Os soros contra estas bactérias existem apenas em laboratórios de pesquisa. Apesar de o cultivo ser ainda o padrão ouro, as técnicas de diagnóstico molecular pela metodologia da PCR tem sido a melhor escolha na identificação destas bactérias. Em adição, existe a dificuldade na obtenção de amostra clínica adequada e recente. O tempo de transporte da amostra clinica em solução ideal influencia o sucesso do cultivo. Devido ao fato de que algumas espécies são muito fastidiosas, as técncas de diagnóstico molecular são cada vez mais aplicadas (AMIRMOZAFARI et al., 2009; BALABANOV et al., 2006; BUZINHANI et al., 2007; TULLY, 1993).

Baseando-se nas vias de obtenção de ATP dos molicutes, os procedimentos bioquímicos para a identificação presuntiva incluem hidrólise da uréia, fermentação da glicose, hidrólise da arginina, atividade de fosfatase, formação de filmes e bolhas, redução do tetrazólio, liquefação de soro coagulado e hidrólise da caseína (BROWN; WHITCOMB; BRADBURY, 2007; OLSON et al., 1993).

1.6 Tratamento e controle de micoplasmas de interesse veterinário

A ausência de recursos imunoprofiláticos eficazes s contra as micoplasmoses genitais nos animais determina que o controle destas enfermidades dependa de medidas de higiene e de procedimento sanitários, incluindo-se a segregação dos hopedeiros infectados, uso de pipetas e ou de preservativos de inseminação duplos (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004), além de minimizar o contato com a vulva

durante a inseminação artificial, transferência de embriões e nas infusões intrauterinas (DIAS, 2002).

As formas de controle indicadas para as micoplasmoses que interferem a reprodução bovina são a antibioticoterapia local, preventiva para as infecções genitais nas fêmeas e sistêmicas para os casos de infecções em machos. A ausência de parede celular nos molicutes indica a utilização de antibióticos cuja ação seja sobre a síntese protéica. As drogas preconizadas têm sido tartarato de tilosina, oxitetraciclina e fumarato de tiamulina. A enrofloxacina foi utilizada com bons resultados práticos, porém a sua eficácia específica contra os micoplasmas que habitam o sistema urogenital de bovinos ainda não foi comprovada (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

Vacinas para micoplasmoses importantes, incluindo a pleuropneumonia contagiosa bovina e caprina, são usadas há muito tempo, e consistem principalmente em tecido infectado ou fluidos que são inoculados nos locais em que o risco de infecção grave é baixo. As vacinas atuais ainda consistem de cepas atenuadas de baixa passagem. No entanto, pouco progresso tem sido realizado no desenvolvimento de alternativas seguras, definidas e de proteção efetiva. Não existem vacinas comerciais para *Mycoplasma bovis*, mas existem algumas em desenvolvimento, apesar da evidência de que esta é a principal causa de pneumonia dos vitelos, mastite e artrite (NICHOLAS et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a resposta imunológica em conseqüência da infecção de macrófagos e blastocistos bovinos por *U. diversum* e a capacidade de invasão deste micro-organismo em blastocistos bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de resposta inflamatória a partir da quantificação da produção de citocinas em macrófagos e blastocistos bovinos infectados com diferentes inóculos e com as cepas viáveis ou inativadas de *U. diversum*.
- Analisar a via de reconhecimento e qual o padrão de reconhecimento de patógenos pela expressão gênica de Toll Like Receptors em macrófagos e blastocistos bovinos infectados com diferentes inóculos e com as cepas viáveis ou inativadas de *U. diversum*.
- Analisar possibilidade de ocorrência de danos oxidativos pela mensuração da produção de nitrito em macrófagos e blastocistos bovinos infectados com diferentes inóculos e com as cepas viáveis ou inativadas de *U. diversum*.
- Investigar a interação e possíveis alterações morfológicas pela avaliação da capacidade de internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos.
- Correlacionar os dados da infecção experimental proposta com a expressão de citocinas e expressão gênica de marcadores imunológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Foram utilizados um isolado clínico de *U. diversum,* obtido do muco vulvo-vaginal de uma fêmea bovina em São Paulo (IC-GOTA) e a cepa de referência ATCC (49782). Os micro-organismos são pertencentes ao laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

3.2 Inóculo de *U. diversum*

Foi utilizado o Meio Ureaplasma (UB) (RUHNKE e ROSENDAL, 1994), líquido e sólido. Os subcultivos foram realizados inoculando-se 1 mL do estoque congelado a -75 °C de cada amostra de ureaplasma em 9 mL de meio líquido, incubados a 37°C, em aerobiose. As culturas foram separadas em alíquotas de 1 mL e congeladas a -75 ºC. Foi realizada PCR espécie-específica com os primers UD3 e UD4 para confirmação da espécie *U. diversum* (CARDOSO et al., 2000). Cada alíquota de ureaplasma estocada a -70 °C foi novamente subcultivada em 9 ml em caldo UB e expandidas até o volume final de 50 mL. O crescimento foi caracterizado pela alcalinização do meio pela hidrólise da uréia utilizando-se indicador de pH o vermelho de fenol. No meio sólido, observou-se a formação de pequenas colônias granulosas com aproximadamente 500 µm e de coloração marrom escuro, resultante da precipitação de cátions de manganês pela atividade da urease (RUHNKE e ROSENDAL, 1994).

Os ureaplasmas (50 mL de cultura) foram coletados por centrifugação, no final da fase de crescimento logarítmica, lavados duas vezes e finalmente homogeneizados em solução fosfato-salina tamponada (PBS). A quantificação do inóculo bacteriano (10^5 a 10^7 ureaplasma/mL) foi realizada por diluição decimal para a determinação da Unidade de Mudança Colorimétrica (“Color Change Unit” - CCU) (TAYLOR-ROBINSON, 1983). Tal método consiste no cultivo em diluição decimal seriada em meio líquido com o indicador colorimétrico para mensurar os títulos de crescimento do micro-organismo. A última diluição que apresenta crescimento é considerada como CCU.

3.3 Infecção de macrófagos murinos J774

A linhagem celular de macrófagos murinos J774 (ATCC1TIB-67™), foi cultivada em microplaca de poliestireno utilizando meio MEM com 5% de soro fetal bovino e sem antibióticos (incubadas a 37 °C a 5% de CO_2). Ao atingir a confluência de aproximadamente 70% (~10^6/mL), as células foram lavadas com meio MEM e incubadas com a cepa ATCC *U. diversum* e do mesmo modo, com o isolado IC-GOTA, viáveis e inativados (100 °C por 30 minutos), por 24 horas. Controles negativos, um somente com células e outro apenas com o meio, foram mantidos.

3.3.1 Dosagem de citocinas

O sobrenadante das culturas da célula J774 infectadas e não infectadas com ureaplasma foram tituladas quanto a produção das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 utilizando-se o *kit* Ready-SET-GO enzyme-linked immunosorbent assay kit (eBioscience, San Diego, USA). Os resultados foram obtidos pela absorbância em leitor de ELISA e os valores foram transformados em pg/mL.

3.3.2 Expressão gênica de TLR's e vias de inflamossoma

O mRNA das células infectadas com ureaplasma foi extraído com a utilização de TRIZOL® (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi obtido por meio da retro-transcrição (RT) a partir do mRNA, utilizando-se o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase com adição de oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm (Oligo dT) e inibidor de RNAse. Com o cDNA produzido, foi realizada a qPCR para verificar, por expressão gênica, quais TLR's 1-9 e 11 estão envolvidos com a resposta à infecção produzida (INOUE et al., 2011). A expressão gênica dos marcadores inflamatórios foi verificada pela metodologia de PCR *array*. O cDNA obtido foi submetido à análise pelo *kit* Mouse Inflammasomes PCR Array (Qiagen-SABioscience), para a avaliação de 84 genes envolvidos na resposta da célula hospedeira à infecção por ureaplasma. As análises da expressão relativa de cada gene foi realizada utilizando o método de 2(-Delta Delta C(T)) (RAO et al., 2013). Os controles endógenos utilizados foram β-

actina, β-2-microglobulina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β-glucuronidase, proteína de choque térmico 90-α (*Hsp90ab1*).

3.4 Infecção de macrófagos bovinos

As coletas de sangue foram realizadas por médico veterinário certificado e de acordo com as disposições de ética para pesquisa animal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas conforme protocolo nº 87 (folha 22, livro 03).

3.4.1 Coleta e seleção de macrófagos bovinos

As amostras de 70 ml de sangue periférico foram coletadas em tubos de coleta de sangue vacutainer heparinizados, através de punção venosa da veia jugular (GONDAIRA et al., 2015). Todas as amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente e processadas em até 2 horas após a coleta. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas por centrifugação (200 x g durante 10 min a 4 °C) em gradiente de Ficoll e ressuspensas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO) e antibióticos. Após a avaliação da quantidade e viabilidade adequada das células, estas foram mantidas a 37 °C com 5% de CO_2 por 6 horas. Após a diferenciação em macrófagos é possível minimizar alterações de expressão de genes associados com o *stress* celular causado pelo processo de isolamento. A diferenciação de monócitos em macrófagos aderentes foi confirmada por microscopia (ALMEIDA et al., 1992; AGNEW e COLDITZ, 2008; GONDAIRA et al., 2015; LEWANDOWSKA-SABAT et al., 2013).

3.4.2 Infecção de PBMC com *Ureaplasma diversum*

As PBMC bovinas foram incubadas com o inóculo de *U. diversum* da cepa ATCC *U. diversum* e o isolado IC-GOTA viáveis e inativados (100 °C por 30 minutos) e com diferentes CCU, por 24 horas. Controles negativos foram constituídos de PBMC acrescidas de PBS 1X e outro apenas o meio de cultura

RPMI. Como controle positivo utilizou-se também LPS (*Lipopolysaccharides E. coli 0111:B4;* Sigma).

3.4.3 Dosagem de nitrito

O sobrenadante da cultura de macrófagos bovinos foi armazenado a -70°C e submetido à reação de Griess para determinação de nitrito. Resumidamente, a concentração de nitrito foi determinada pela adição de 50 ul do sobrenadante da cultura de macrófagos em placas de 96 poços de fundo plano contendo 50 ul de reagente de Griess [1% de sulfanilamida/0,1% de N- (1-naftil) etilenodiaminadicloridrato/2,5% H_3PO_4] (Merck). As amostras foram avaliadas em triplicata. Após incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, a absorbância de cada poço foi avaliada por um leitor de microplacas em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (STUEHR; NATHAN, 1989).

3.4.4 Expressão gênica de Toll Like Receptors e citocinas em macrófagos bovinos infectados com *U diversum*

O mRNA das células infectadas com ureaplasma foi extraído com a utilização de TRIZOL®, de acordo com o o protocolo do fabricante. O cDNA foi obtido por meio da retro-transcrição (RT) a partir do mRNA, utilizando-se o *kit* SuperScript® III Reverse Transcriptase com adição de oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm (Oligo dT) e inibidor de RNAse. Com o cDNA sintetizado, foi realizado RT^2 qPCR Primer Assay, com *primers* específicos para bovinos para avaliar, por expressão gênica, a secreção das citocinas IL-1β e TNF-α, além dos TLR's 2 e 4. A reação foi realizada utilizando-se do StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil), com o programa recomendado. A curva de Melting foi avaliada ao final da reação para observar a especificidade da amplificação. Os dados foram analisados pelo método comparativo (ΔCt) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

3.5 Infecção de blastocistos bovinos

Os blastocistos foram produzidos no laboratório de fertilização *in vitro* do departamento de reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.5.1 Fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário

O meio para maturação oocitária (MIV) consistiu em meio de cultura para tecidos 199 tamponado com solução HEPES (TCM 199) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco), piruvato sódico (22 mg/mL), gentamicina (50 µg/mL), FSH (0,5 µg/mL), LH (6 µg/mL) e estradiol (1 µg/mL). Para a lavagem dos oócitos antes da FIV foi utilizada a solução HEPES-TALP (TL-HEPES), contendo sais de Tyrode's BSA (3 mg/mL), piruvato sódico (22 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL). O TALP-FIV usado nas gotas de FIV continha sais de Tyrode's BSA (6 mg/mL), piruvato sódico (22 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL) e heparina (20 µg/mL). Para o cultivo dos embriões (CIV) foi utilizado o meio comercial KSOM (Millipore, P-020) suplementado com BSA, aminoácidos essenciais e não-essenciais e gentamicina. O meio de cultivo KSOM foi obtido liofilizado (KSOM, Millipore, 020-P), homogeneizado em diluente do *kit* e armazenado em alíquotas de 6 mL à -20ºC por até 2 meses. Após o período de oito dias de cultivo, os embriões foram transferidos para um meio de cultivo sem antibióticos para a realização da infecção com os ureaplasmas. Em seguida foi utilizado o meio SOF suplementado com SFB e aminoácidos essenciais e não essenciais. Para cada fase foram utilizadas gotas (90 µL para maturação e fertilização e 60 µL para cultivo e infecção) de cada meio específico em placas de poliestireno e cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) para prevenir ressecamento do meio durante a incubação.

3.5.1.1 Coleta de oócitos e maturação in vitro (MIV)

Ovários de vacas destinadas ao abate comercial foram coletados e transportados ao laboratório em solução fisiológica à 30 ºC até uma hora *post-mortem* das vacas. Os complexos *cumulus oophorus* (COCs) foram recuperados

pela aspiração de folículos com 2-8 mm de diâmetro com seringa de 5 ml, acoplada a agulha 21G e o fluído folicular mantido em tubos de 15 mL para formação de sedimento à 35 ºC, durante 10 minutos. Foram selecionados COCs com camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo. Após três lavagens em meio de lavagem e três vezes em meio MIV, os oócitos foram divididos em gotas de 90 µL de meio de maturação contendo 15 a 25 oócitos sob óleo mineral, incubados por 22-24 horas a 38,5 °C com 5% de CO_2 e umidade saturada.

3.5.1.2 Preparação do sêmen e Fertilização in vitro (FIV)

Os oócitos maturados foram lavados em meio TL-HEPES e transferidos também em grupos de 25 oócitos para gotas de 90 µL de meio FIV. O sêmen utilizado para a fertilização foi obtido de paletas com 0,250 mL pré-congeladas do mesmo touro nelore de um centro brasileiro Inseminação Artificial. Após descongelamento, o sêmen foi centrifugado em gradiente de densidade descontínua de Percoll (0,4 mL de Percoll 45% sobre 0,4 mL de Percoll 90%) por 6 minutos a 9000 g a temperatura ambiente. O *pellet* espermático foi lavado em meio TALP a 9000 g por 3 minutos. Os espermatozoides foram avaliados quanto à concentração e motilidade para obter a concentração aproximada de $1x10^6$ espermatozóides/mL pela diluição em meio FIV (meio TALP suplementado com 3 mg/mL de heparina e solução de PHE [2 mM de penicilina, 1 mM de hipotaurine e 250 mM de epinefrina], Sigma-Aldrich). Em cada gota com 15-25 oócitos maturados foram adicionados 4 µL de sêmen para a obtenção aproximada de 10.0000 espermatozóides viáveis. As placas foram incubadas novamente nas mesmas condições por 18-20 horas.

3.5.1.3 Cultivo in vitro (CIV)

Após o período de incubação no final do item anterior, removeu-se as células do *cumulus* por pipetagem repetitiva dos presumíveis zigotos (PZ) em três gotas de meio de lavagem FIV. Em seguida, foram transferidos em gotas de 60 µL de meio CIV (KSOMaa) em grupos com 15-25 PZ e incubados até o dia 8 de cultivo pós-fertilização em umidade saturada a 38,5 °C e atmosfera com 5% de CO_2, 5% de O_2 e 90% de N_2. Após três dias de cultivo, a capacidade de fertilização foi avaliada de

acordo com a taxa de clivagem e foi realizado um primeiro *feeding* com a troca de metade do volume da gota por meio CIV suplementado com 10% de SFB para a concentração final de 5% do volume total. No quinto dia de cultivo foi realizado o segundo *feeding* com a adição de meio CIV 5% de SFB.

3.5.1.4 Classificação e seleção dos embriões

Após 8 dias de cultivo em meio KSOM, os blastocistos foram lavados em 3 gotas de SOF sem gentamicina para remover resíduos de antibiótico do meio anterior. Foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento (blastocisto eclodido, blastocisto expandido, blastocisto, blastocisto inicial), agrupados conforme o grupo experimental (controle, ATCC 49782 e IC-GOTA) e acomodados em placas contendo uma gota de 60 µL de meio SOF sem gentamicina e incubados a 38,5 °C em estufa úmida a 5% de CO_2.

3.5.2 Marcação de ureaplasmas com fluoresceína

O método utilizado foi descrito por Basemam et al (1995), com modificações. Os ureaplasmas foram primeiramente cultivados em 50 mL de meio UB a 37 ºC. As bactérias foram centrifugadas a 20.600 g por 30 min e o sedimento foi lavado duas vezes com PBS. No sedimento foram adicionados 500 µl de *carbocyanine dye solution* (VybrantTM Dil cell-labeling solution-Dil, V-22885, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA - diluição 1:200) e incubado a 37 ºC por 40 min. Os ureaplasmas marcados foram centrifugados a 20.600 g por 10 min, lavados duas vezes com PBS e homogeneizados para a inoculação nas culturas de blastocistos.

3.5.3 Infecção dos blastocistos com *Ureaplasma diversum*

Em cada gota de 60 µL de meio SOF sem gentamicina contendo de 5-18 blastocistos, foram adicionados aproximadamente 6,7 µL de inóculo bacteriano (proporção de crescimento de micoplasmas 1:10) para os grupos tratados e o mesmo volume de PBS 1x para o grupo controle. Foram incubados nas mesmas condições por 24 horas. Após este período, aproximadamente 25 µL do meio de

cultivo foi removido e armazenado para posterior dosagem de citocinas. Em seguida, 30 µL de SOF com gentamicina (1:100) foram adicionados e incubados novamente por 3 horas para eliminar os micro-organismos que não invadiram as células para quantificação posterior daqueles que internalizaram o embrião. Após o período de incubação com a gentamicina, as células foram removidas e lavadas em 3 gotas de 200 µL de SOF com gentamicina por 5 minutos.

3.5.4 Microscopia confocal

Os blastocistos infectados com ureaplasmas previamente marcados e os blastocistos do grupo controle foram fixados em paraformaldeído 4% por 60 minutos e estocados em PBS-PVP (polivinilpirrolidona) a 8 °C. Foram permeabilizadas 0,5% de Triton X-100 por 20 minutos, seguido de incubação em faloidina associada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 90 minutos, para marcar os microfilamentos de actina. Após lavagem com PBS, foi adicionado fluido Vecta-Shield (Vector Laboratories Inc.®) e TOPRO-3 para visualização dos núcleos pela marcação do DNA das células sobre as lâminas. As células foram transferidas para lâminas, cobertas por lamínula sobre quatro apoios para evitar a deformidade das células. O sistema foi vedado para evitar ressecamento e realizou-se a diferenciação em microscópio confocal (Carl Zeiss LSM 10®), equipado com laser Argon (emissão 488 nm) e hélio/neônio (emissão 543 nm).

3.5.5 Dosagem de nitrito

A dosagem de nitrito foi feita pela reação de Griess, da mesma maneira realizada para os macrófagos bovinos (STUEHR; NATHAN, 1989).

3.5.6 Extração de RNA e produção de cDNA

Após o período de incubação, as células foram removidas e lavadas em 3 gotas de 200 µL de SOF com gentamicina por 5 minutos. Em seguida, foram divididas em alíquotas de tampão de extração de RNA (20 µL para grupos de 10

estruturas), incubadas a 42 °C por 30 minutos e imediatamente congeladas a -70 °C até a extração de RNA pelo Pico Pure™ RNA Isolation Kit (Quiagen-SABioscience). A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do *kit* PicoPure™, ou seja, será realizado o tratamento com DNAse, e a eluição do RNA em 11µL da solução de eluição do *kit.* A obtenção do cDNA foi por meio da retro-transcrição (RT) a partir do mRNA, utilizando-se o *kit* SuperScript® III Reverse Transcriptase com adição de oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm (Oligo dT) e inibidor de RNAse.

3.5.7 Expressão gênica de marcadores inflamatórios

Com o cDNA sintetizado, foi realizado RT² qPCR Primer Assay, com *primers* específicos para bovinos para avaliar, por expressão gênica, a secreção das citocinas IL-1β e TNF-α, além dos TLR's 2 e 4. A reação foi efetuada utilizando-se o StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil), com o programa recomendado. A curva de Melting foi avaliada ao final da reação para observar a especificidade da amplificação. Os dados foram analisados pelo método comparativo (ΔCt) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

3.6 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para determinar as diferenças entre os grupos experimentais utilizando GraphPad-Prism (2016) ($P \leq 0,05$). Para análises dos dados de quantificação de citocinas e expressão gênica de TLR's, assim como para as informações de expressão gênica de vias de inflamassoma foram analisadas estatisticamente, considerando $p<0,05$ e IC 95%.

4 RESULTADOS

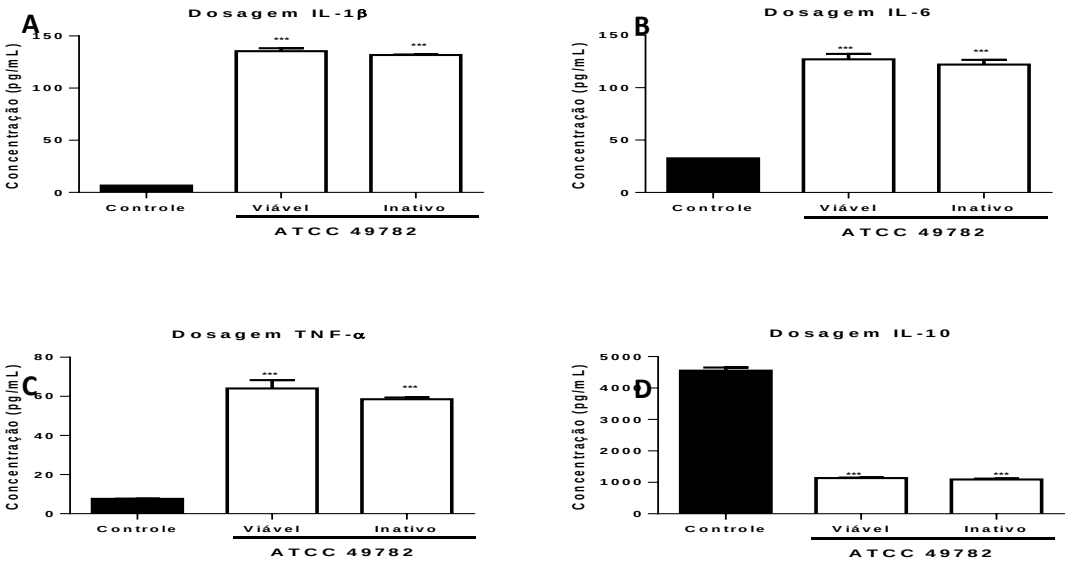
4.1 Infecção de macrófagos murinos (J774) com *Ureaplasma diversum*

Após 24 horas de infecção, os controles negativos não demonstraram alterações morfológicas e os resultados obtidos são demonstrados nas figuras 5 a 8.

4.1.1 Análise da produção de citocinas

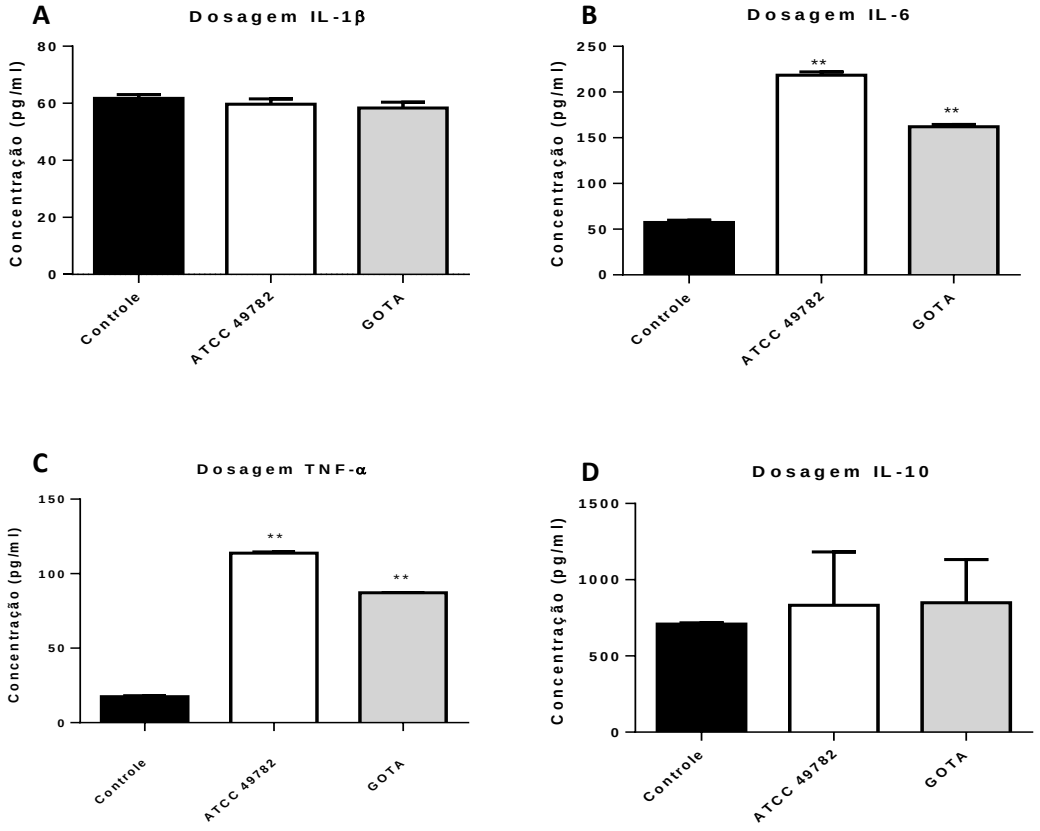
De acordo com os resultados apresentados nas figuras 5 e 6, houve maior produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α em relação ao controle, indicando a ocorrência de processo inflamatório. No entanto, não houve diferença estatística entre o perfil de citocinas obtido entre as amostras vivas e mortas da mesma cepa (Figura 5).

Figura 5 - Quantificação de citocinas do sobrenadante da cultura de macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas por *U. diversum* ATCC 49782.



Legenda: Dosagem de citocinas pelo método de ELISA do sobrenadante da cultura de macrófagos murinos experimentalmente infectados pela cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 viável (+) e inativada por calor (-) (100 °C; 30'). Controle negativo PBS 1X. Dosagem de IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C) e IL-10 (D). Kit eBioscience. Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo).

Figura 6 - Quantificação de citocinas do sobrenadante da cultura de macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas pelas cepas de referência e isolado clínico de *U. diversum*.



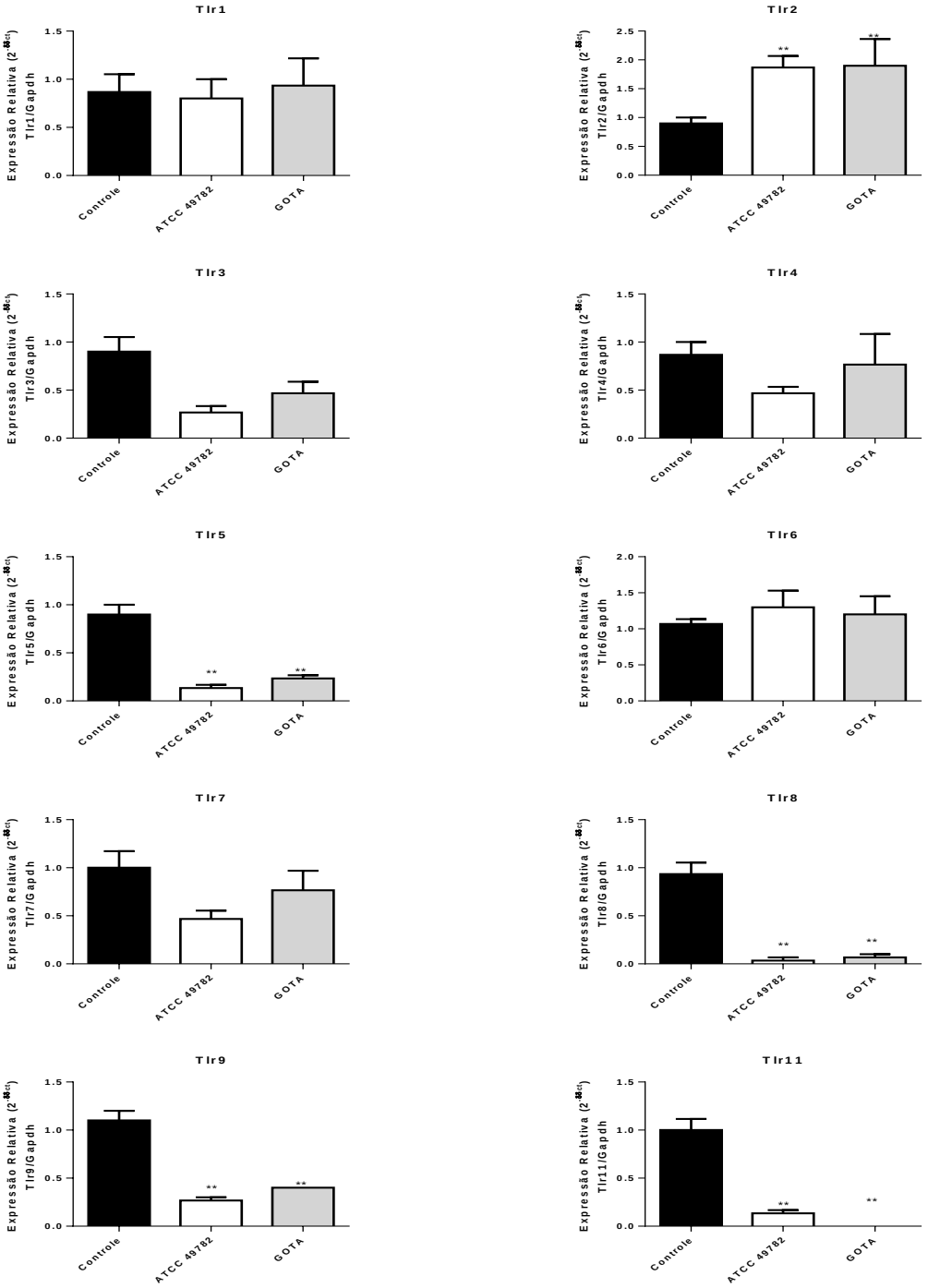
Legenda: Dosagem de citocinas pelo método de ELISA do sobrenadante da cultura de macrófagos murinos experimentalmente infectados pela cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 e pelo isolado clínico GOTA. Controle negativo PBS 1X. Dosagem de IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C) e IL-10 (D). Kit eBioscience. Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo).

4.1.2 Expressão gênica de *Toll Like Receptors* (TLR's) e vias de ativação de inflamossoma

Para cada TLR, comparou-se a expressão entre as cepas de ureaplasma testadas. Foi possível observar que, para ambas as cepas, houve maior expressão gênica do TLR2 e sub-expressão dos TLR's 5, 8, 9 e 11 (Figura 7). Na avaliação dos 84 genes relacionados à ativação de inflamossomas, nove foram super-expressos e

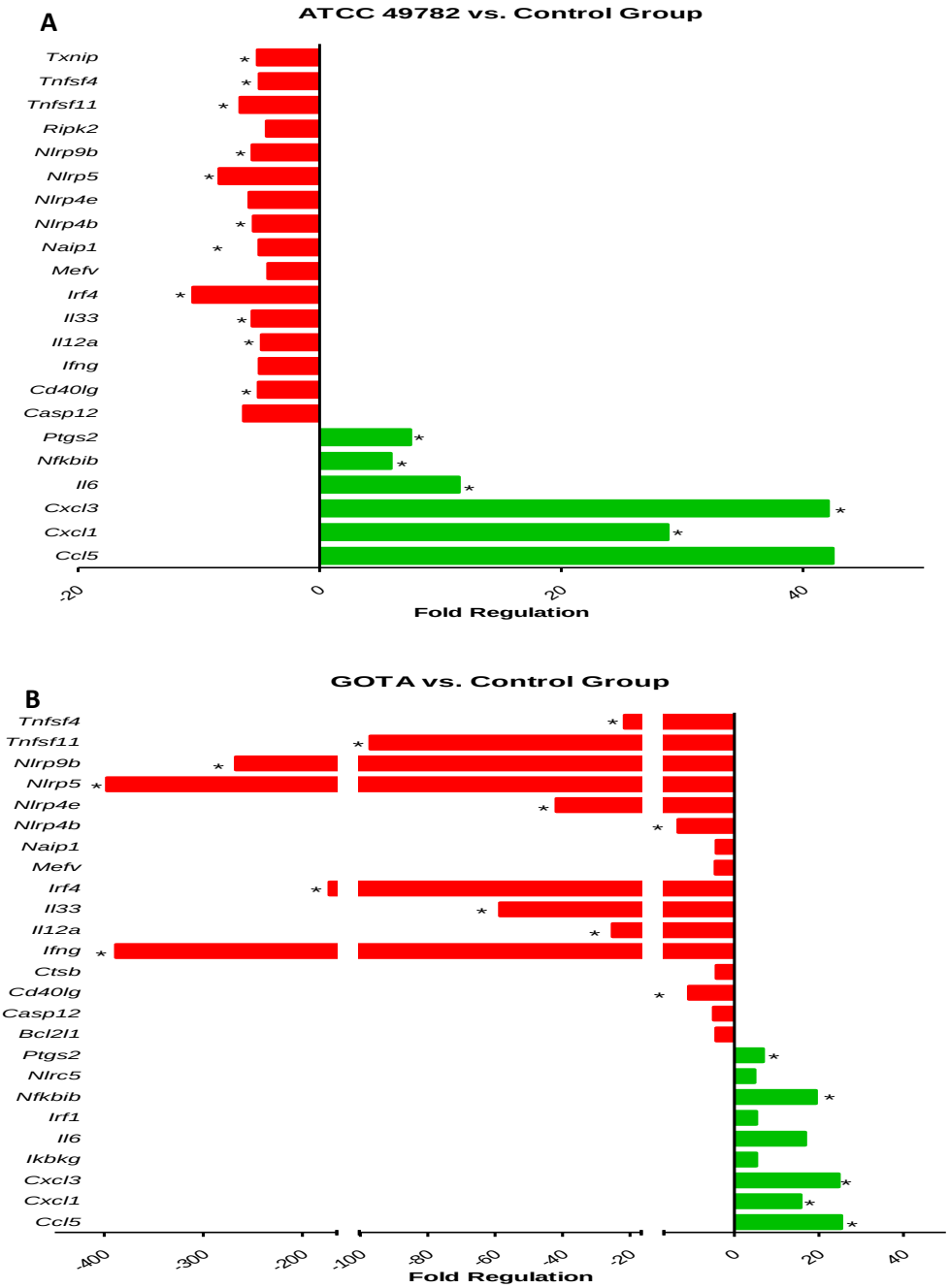
19 sub-expressos (Figura 8). Foram super-expressos genes relacionados a alguns domínios de ligação a quimiocinas, interleucina 6, inibidores de quinases e células B, NF-κB, reguladores de interferon e prostaglandina-endoperóxido. Em contrapartida foram sub-expressos, dentre outros, os genes de caspase 12, CD40 ligante, interferon gama, interleucina 12A e 33, famílias de NLR e ligante de fator de necrose tumoral. A cepa GOTA induziu significadamente a super-expressão do gene *nlrc5*, que codifica um membro da família que contém o domínio de recrutamento de caspase NLR (Nod Like Receptor).

Figura 7 - Expressão gênica de TLR's em macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*.



Legenda: Expressão gênica dos TLR's 1-9 e 11 por qRT-PCR de macrófagos murinos após a infecção experimental pela cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 e pelo isolado clínico GOTA. Controle negativo com células não infectadas. Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (grupos teste em relação ao controle negativo).

Figura 8 - Expressão gênica de vias ativação de inflamossoma em macrófagos murinos (J774) experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*.



Legenda: Expressão gênica relativa, por qPCR *array,* de marcadores de vias de inflamossoma de macrófagos murinos experimentalmente infectados pela cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 (A) e isolado clínico GOTA (B) em relação ao controle negativo (células não infectadas). Genes super-expressos (verde), genes sob-expressos (vermelho). Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (grupos teste em relação ao controle negativo).

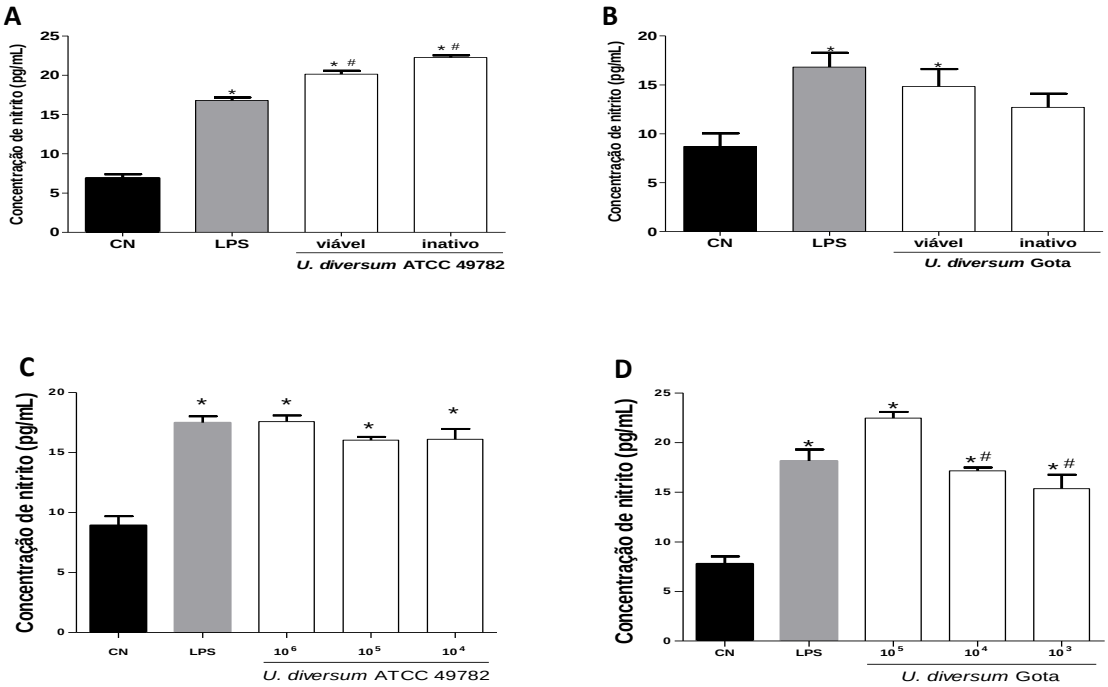
4.2 Infecção de macrófagos bovinos por *Ureaplasma diversum*

Após 24 horas de infecção, os controles negativos não demonstraram alterações morfológicas e os resultados obtidos são demonstrados nas figuras 9 a 11.

4.2.1 Dosagem de nitrito

A produção de nitrito pelos macrófagos infectados pela cepa de referência ATCC 49782, foi estatisticamente significante maior em relação ao controle negativo e positivo, tanto para o micro-organismo vivo quanto inativado. A quantidade de nitrito produzida pelos macrófagos na presença do isolado clínico GOTA, foi maior apenas na presença da cepa viável, em relação ao controle negativo (Figura 9 A e B).

Figura 9 - Quantificação de nitrito do sobrenadante da cultura de macrófagos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *Ureaplasma diversum*.



Legenda: Dosagem de nitrito pelo método de Griess do sobrenadante da cultura de macrófagos bovinos experimentalmente infectados pela cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 e pelo isolado clínico GOTA. Controle negativo PBS 1X. Micro-organismos viáveis e inativados (100°C; 30') (A e B) e diferentes inóculos (CCUs) (C e D). Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo) (#) pós teste de Dunn (diferença entre amostras de um mesmo grupo – diferentes CCU de uma mesma amostra).

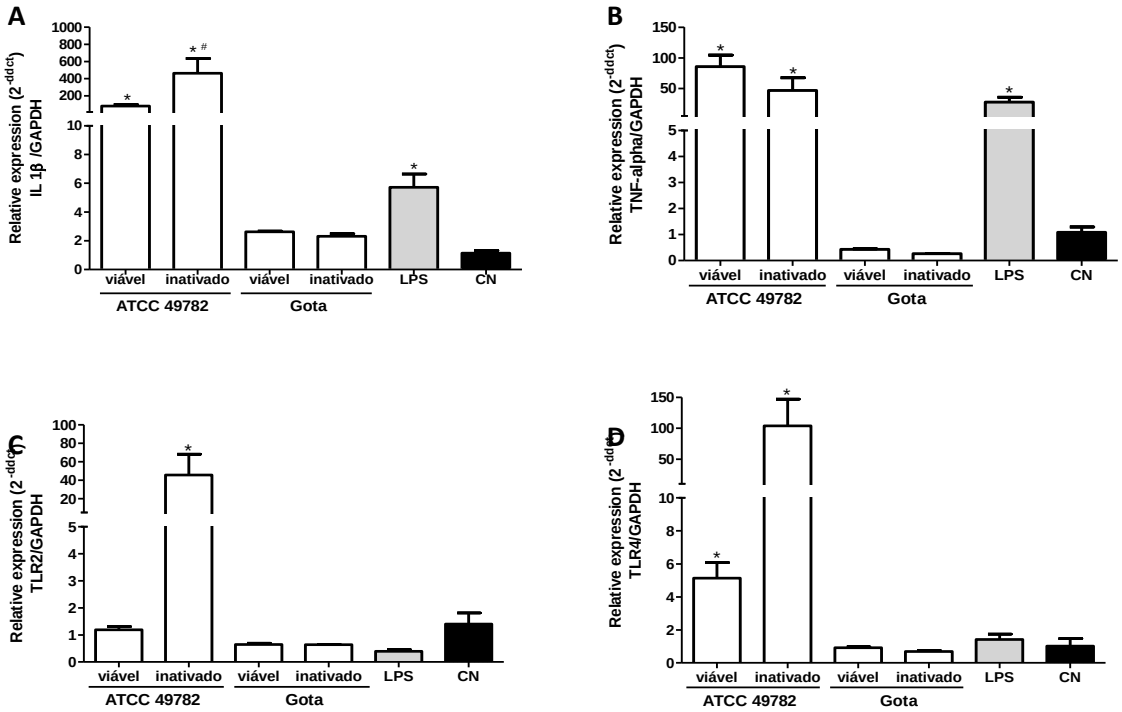
Na presença de diferentes concentrações de inóculo de ureaplamas, as concentrações de nitrito foram maiores que o controle para ambas as cepas inculadas nos macrófagos bovinos. Na presença da cepa ATCC 49782 com CCUs de 10^6, 10^5 e 10^4, as concentrações de nitrito foram estatisticamente maiores que o controle negativo, mas sem diferenças entre os inóculos e em relação ao controle positivo. Para a cepa GOTA, as concentrações de nitrito foram significativamente maiores em relação ao controle negativo para o controle positivo e para todas as

CCU testadas (10^5, 10^4 e 10^3). Apenas nas CCUs de 10^4 e 10^3 a concentração de nitrito foi menor que a CCU de 10^5 (Figura 9 C e D).

4.2.2 Expressão gênica de citocinas e Toll Like Receptors (TLR's)

Na presença da cepa de referência ATCC 49782, viva ou morta, houve maior expressão gênica de IL-1β, TNF-α e TLR4 pelos macrófagos bovinos. A cepa de referência morta induziu maior expressão de IL-1β e TLR2 em relação a cepa viva (Figura 10).

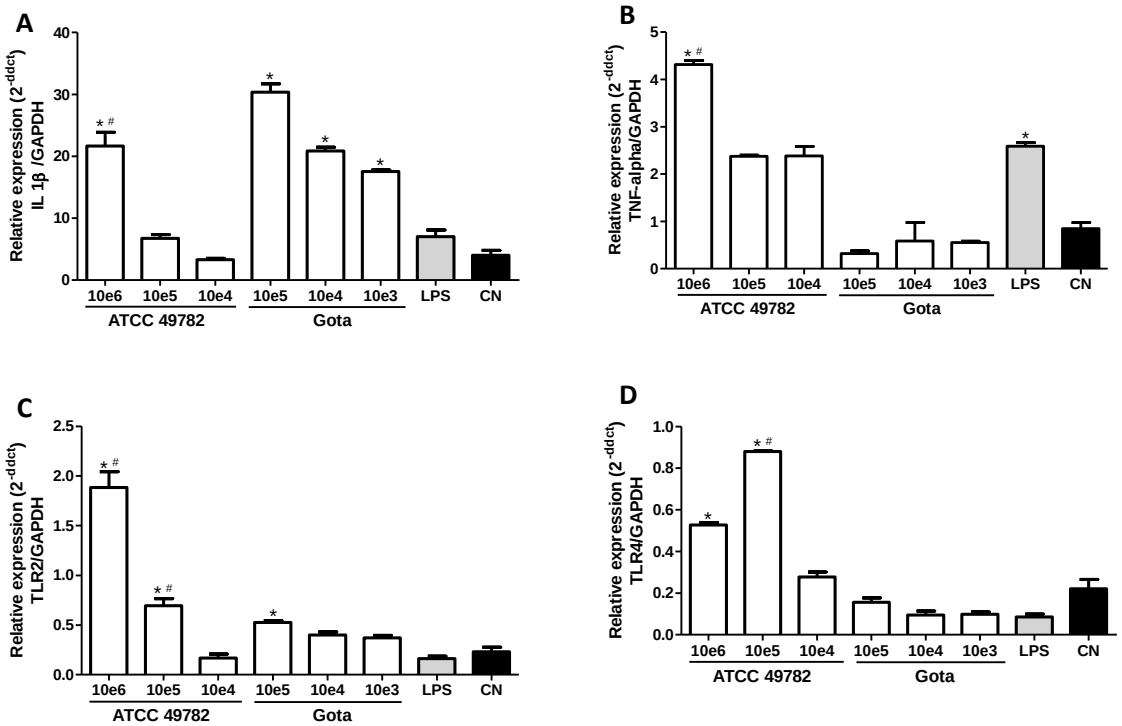
Figura 10 – Expressão gênica de citocinas e TLR's em macrófagos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*, viáveis e inativados.



Legenda: Expressão gênica relativa, por qPCR *assay,* das citocinas IL-1β (A) e TNF-α (B) e dos TLR's 2 (C) e 4 (D) em macrófagos bovinos experimentalmente infectados pela cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 e isolado clínico GOTA. Controle negativo PBS 1X. Micro-organismos viáveis e inativados por calor (100 °C; 30'). Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo) (#) pós teste de Dunn (diferença entre amostras de um mesmo grupo – viável x inativado).

A infecção com diferentes concentrações de ureaplasma induziu a produção de diferentes perfis de expressão gênica das citocinas (Figura 11). Para o isolado clínico GOTA, a expressão de IL-1β foi significativamente maior que o controle negativo para as três CCU testadas (10^5, 10^4 e 10^3) e apenas na CCU de 10^5 a expressão do TLR2 foi maior. A expressão dos genes IL-1β e TNF-α foi maior que o controle negativo apenas na presença da cepa de referência na CCU de 10^6, assim como em relação às outras CCU testadas para a mesma cepa. Os genes TLR's 2 e 4 foram mais expressos que o controle negativo na presença de *U. diversum* ATCC 49782 na CCU de 10^6 e 10^5, com diferença estatística também entre estas diferentes concentrações de inóculo testadas.

Figura 11 - Expressão gênica de citocinas e TLR's em macrófagos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas com diferentes inóculos da cepa de referência e do isolado clínico de *U. diversum*.



Legenda: Expressão gênica relativa, por qPCR *assay,* das citocinas IL-1β (A) e TNF-α (B) e dos TLR's 2 (C) e 4 (D) em macrófagos bovinos experimentalmente infectados com as amostras ATCC 49782 e isolado clínico GOTA em relação ao controle. Diferentes concentrações de inóculo bacteriano (CCUs). Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo) (#) pós teste de Dunn (diferença entre amostras de um mesmo grupo – diferentes CCU de uma mesma amostra).

4.3 Infecção de blastocistos bovinos com *U.diversum*

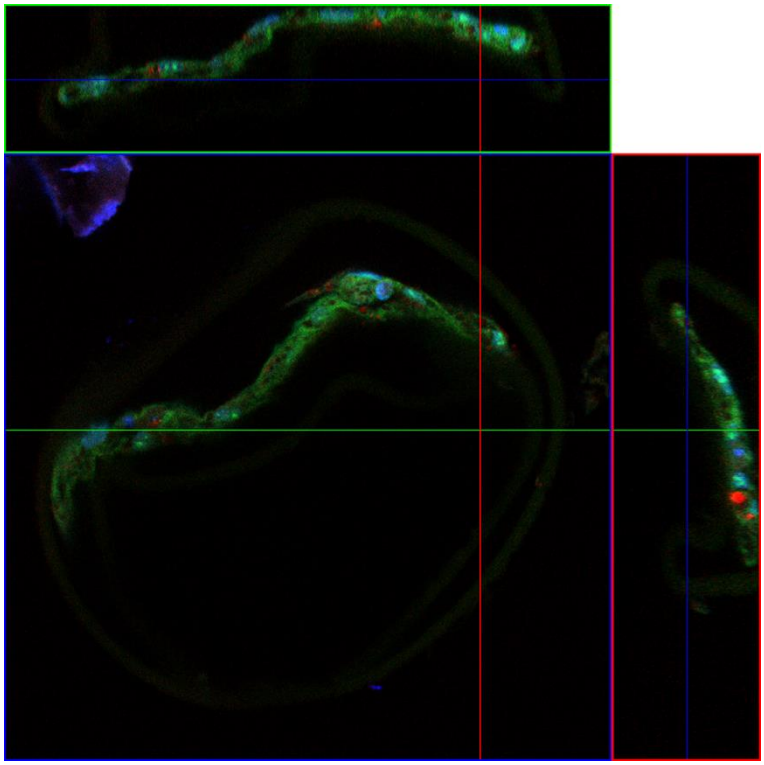
Após 24 horas de infecção, os controles negativos não demonstraram alterações morfológicas e os resultados obtidos são demonstrados nas figuras 12 a 15.

4.3.1 Microscopia confocal

Após a infecção dos blastocistos, fixação em paraformaldeído e marcação fluorescente, foi possível observar a internalização dos micro-organismos. As imagens dos blastocistos infectados evidenciaram a presença de ureaplasmas no espaço citoplasmático (Figuras 12 e 13). Os ureaplasmas marcados foram detectados em vermelho, distinguindo-se da actina em verde e do DNA em azul.

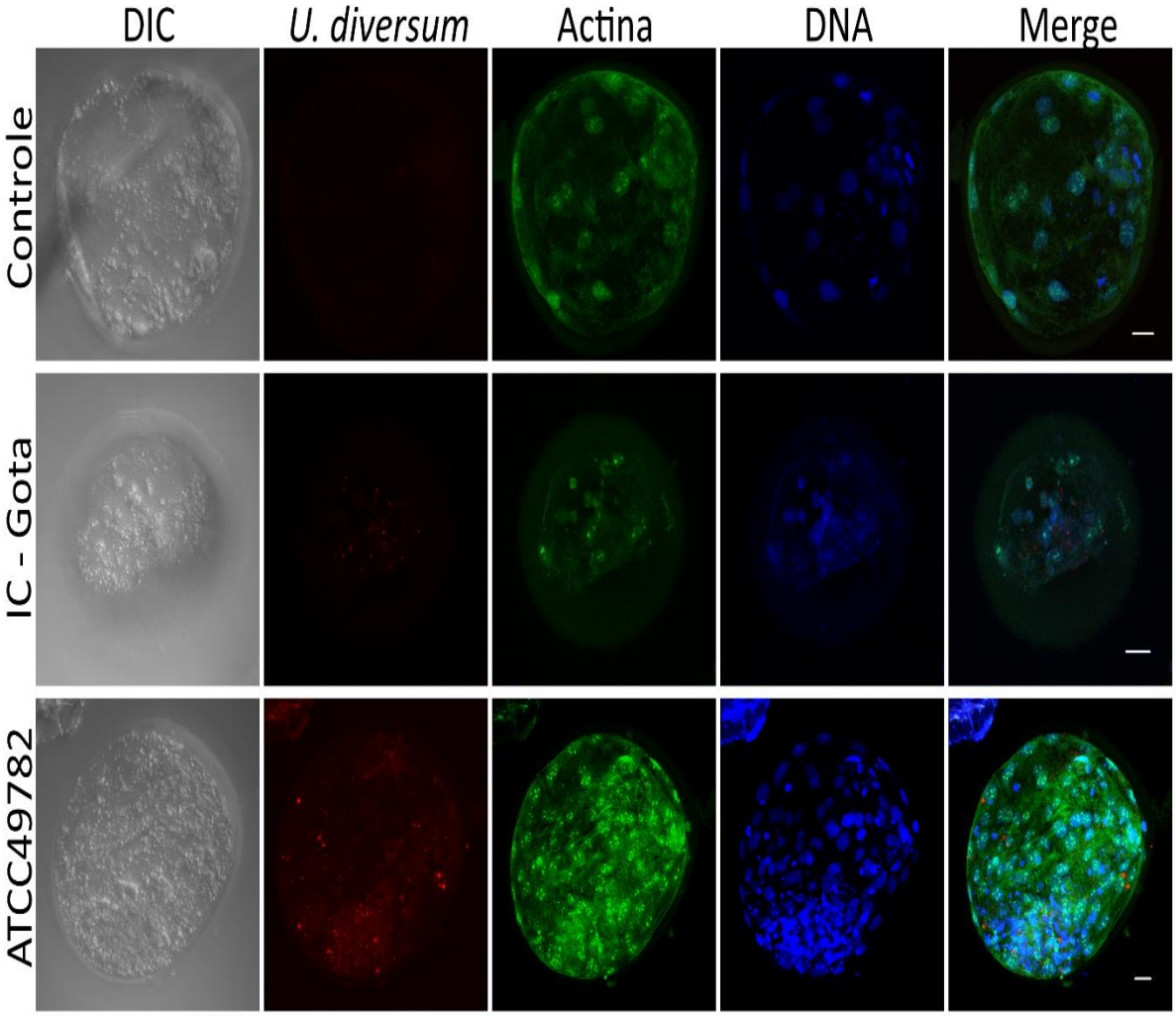
As células infectadas não apresentaram efeito citopático nos períodos de infecção estudados. O fluorocromo Vybrant Dil não apresentou citotoxicidade bacteriana, pois foi verificada a viabilidade dos ureaplasmas após a marcação com fluorocromo. Não foi observada fluorescência intracelular do Vybrant Dil em blastocistos não infectados e marcados com FITC. Imagens obtidas no microscópio confocal variaram da região basal a apical da célula.

Figura 12 – Projeção ortogonal da microscopia confocal evidenciando a internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos após 24 horas de infecção exerimental por *U. diversum*.



Legenda: Microscopia confocal evidenciando a internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos após 24 horas de infecção. Ureaplasmas foram marcados com Vybrant Dil (vermelho), filamentos de actina dos blastocitos foram marcados com FITC (verde) e o núcleo dos blastômeros marcado com TOPRO-3 (azul). Projeções ortogonais evidenciando a presença e distribuição dos ureaplasmas no interior dos blastocistos infectados pela cepa ATCC 49782.

Figura 13 – Microscopia confocal evidenciando a internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos após 24 horas de infecção experimental.

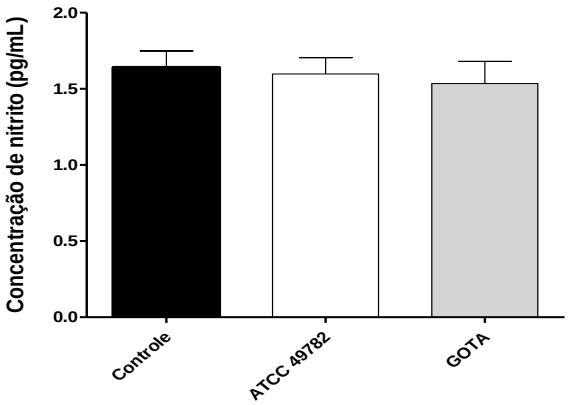


Legenda: Microscopia confocal evidenciando a internalização de *U. diversum* em blastocistos bovinos após 24 horas de infecção. Barras de escala representam 20 µm. Controle negativo, infecção por ATCC 49782 e infecção pelo isolado clínico GOTA. Ureaplasmas foram marcados com Vybrant Dil (vermelho), filamentos de actina dos blastocitos foram marcados com FITC (verde) e o núcleo dos blastômeros marcado com TOPRO- 3 (azul). Em DIC, o contraste interferencial diferencial; *merge*, sobreposição das imagens.

4.3.2 Dosagem de nitrito

A concentração de nitrito das culturas de blastocistos infectados pela cepa de referência ATCC 49782 e pelo isolado clínico GOTA, está apresentada na figura 14. Não houve diferença de concentração estatisticamente significante em relação ao controle negativo para ambas as cepas.

Figura 14 - Quantificação de nitrito do sobrenadante da cultura de blastocistos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas pela cepa de referência e isolado clínico de *U. diversum*.

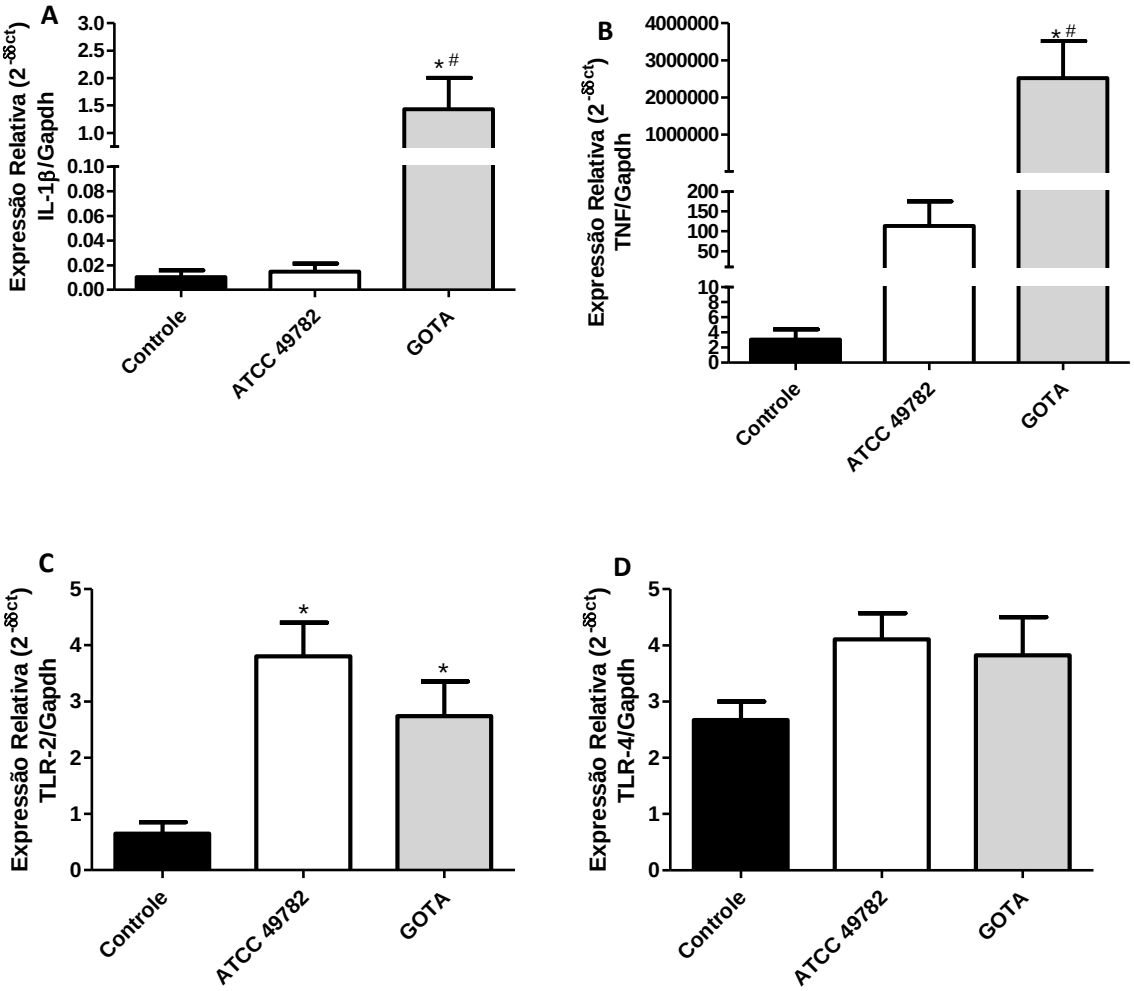


Legenda: Dosagem de nitrito pelo método de Griess do sobrenadante de cultura de blastocistos bovinos experimentalmente infectados pelas cepas de *U. diversum* ATCC 49782 e isolado clínico GOTA. Controle negativo (PBS 1X). Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo).

4.3.3 Expressão gênica de citocinas e Toll Like Receptors (TLR's)

A expressão gênica das citocinas IL-1β e TNF-α foi significativamente maior na presença da cepa GOTA em relação ao controle negativo e à cepa de referência. A expressão do gene TLR2 foi maior nos blastocistos na presença de ambas as cepas, em relação ao controle negativo. O mesmo não foi observado para a expressão do TLR4, o qual não teve alteração na expressão gênica na presença de *U. diversum* (Figura 15).

Figura 15 – Expressão gênica de citocinas e TLR's em blastocistos bovinos experimentalmente infectados por 24 horas com diferentes inóculos da cepa de referência e do isolado clínico de *U. diversum*.



Legenda: Expressão gênica relativa, por qPCR *assay,* das citocinas IL-1β (A) e TNF-α (B) e dos TLR's 2 (C) e 4 (D) em blastocistos bovinos experimentalmente infectados com as amostras ATCC 49782 e isolado clínico GOTA em relação ao controle. Controle negativo PBS 1X. Significância estatística ($p<0,05$) representada por (*) Kruskall-Wallis (diferença de grupos teste em relação ao controle negativo) (#) pós teste de Dunn (diferença entre amostras de um mesmo grupo – ATCC49782 x GOTA).

5 DISCUSSÃO

Existem poucos dados na literatura sobre a resposta imune dos hospedeiros às infecções por *U. diversum.* Também poucos estudos existem quanto ao papel dos macrófagos e seu potencial fagocítico destas bactérias. A literatura descreve parcialmente a função da resposta humoral e o papel de anticorpos, como opsoninas, capazes de promover a atividade dos macrófagos (D'ANGELO et al., 2010). Embora estudos clínicos tenham relatado uma associação entre afecções perinatais e infecção por ureaplasmas, principalmente em humanos, os fatores de virulência de *Ureaplasma spp.* associados a problemas na gestação ainda não são claros. A atividade biológica de várias lipoproteínas de micoplasmas são estudadas *in vitro* (USHIDA et al., 2013*).* A ativação dos TLR's resulta na expressão de citocinas que causam inflamação podendo levar a fagocitose, pela apresentação de antígenos ou a imunidade específica. Estudos com experimentos de cultura de células que indiquem quais motivos moleculares específicos (PAMP's) nos micoplasmas podem explicar a forma como estes organismos provocam as reações inflamatórias, que podem resultar em parto prematuro ou em distúrbios reprodutivos (LARSEN; HWANG, 2010). A patogênese da micoplasmose genital é pouco compreendida (ROSENGARTEN et al., 2000), sendo relevante determinar em bovinos a importância das citocinas envolvidas na regulação do desenvolvimento pré-implantação e quando elas podem agir na infecção por *U. diversum*.

No presente estudo, os resultados evidenciaram um perfil inflamatório durante a infecção experimental por *U. diversum* em macrófagos murinos e macrófagos bovinos. A produção de citocinas pró-inflamatórias foi induzida por células vivas ou inativadas de *U. diversum.* Apesar de ainda não estarem totalmente estabelecidos os mecanismos pelos quais ureaplasmas induzem a produção de citocinas, a capacidade dos *Mollicutes* promoverem a secreção de citocinas inflamatórias como IL-1β, TNF-α e IL-6, foi relatada em diferentes espécies de ureaplasmas e micoplasmas, como por *U. diversum* (SILVA et al., 2016; CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994)*, U. urealyticum* (CROUSE et al., 2012; LI et al., 2000a; LI et al., 2000b)*, M. fermentans* (GARCIA et al., 1998), *M. hyorhinis* (HEIDEGGER et al., 2015), *M. bovis* (WANG et al., 2016; ZBINDEN et al., 2015), *M. hyopneumoniae* (DAMTE et al., 2015), *M. mycoides subsp. Mycoides* (STERNER-KOCK et al., 2016). Estudos sobre colonização e infecções por *Ureaplasma sp*. no trato reprodutivo, também estão

relacionados com a secreção de citocinas como, por exemplo, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 (KACEROVSKY et al., 2013; ROSENGARTEN et al., 2000; VISCARDI, 2013; USHIDA et al., 2013). Alguns estudos descrevem que as respostas inflamatórias com as demais respostas imunes do hospedeiro podem provocar manifestações clínicas resultantes de danos celulares (AMORIM et al., 2014). O sinergismo entre lipoproteínas e a produção de citocinas pró-inflamatórias sugere que as lipoproteínas e constituintes lipídicos de micoplasmas ativam os macrófagos por diferentes mecanismos (BROWNING et al., 2011). As etapas iniciais de interação entre os macrófagos e as lipoproteínas são diferentes, mas as vias de tradução dos sinais intracelulares parecem ser semelhantes, na maioria das vezes envolvendo o TLR2 (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998; ROMAN-ROMAN e RAWADI, 1996; USHIDA et al., 2013; WANG et al., 2016).

Os membros das famílias de TLR's estão distribuídos: 11 em humanos, 13 em camundongos e 10 em bovinos. Com o reconhecimento específico de moléculas dos micro-organismos, os TLR's ativam fatores de transcrição, induzem a liberação de citocinas e expressão de moléculas co-estimulatórias, preparando as células para a ativação e expansão de células antígeno-específicas (JUAREZ et al, 2010; HANKE e KIELIAN, 2011; KAWAI e AKIRA, 2011). No presente estudo, verificou-se pela primeira vez que a expressão gênica dos TLR's após a infecção de macrófagos murinos por *U. diversum* tem aumento significante na expressão do TLR2 em relação ao controle e aos demais TLR's. Com este resultado, após avaliar a expressão gênica apenas dos TLR2 e TLR4, em macrófagos murinos e bovinos infectados com *U. diversum*, também foi observada a ativação do TLR2 para ambas as cepas testadas. O estímulo foi dependente da quantidade de ureaplasmas. Maiores concentrações da cepa de referência também ativaram TLR4. Apenas a cepa de referência inativada ativou o TLR2, enquanto o TLR4 foi ativado na presença da mesma cepa, viável ou não. Este resultado corrobora com a literatura, de que o TLR2 tem sido considerado o principal receptor para a resposta imune aos *Mollicutes* (BROWNING et al., 2011). Allam et al. (2014) observaram maior expressão de TLR2 em tecido placentário murino na presença de *U. parvum*. Do mesmo modo, estudo realizado pela infecção de macrófagos com *U. urealyticum,* demonstrou-se a ativação de TLR2 e TLR4 (PELTIER et al, 2007). O complexo TLR2-TLR6 também foi verificado por desempenhar um papel importante no mecanismo de patogenicidade dos micoplasmas através das suas lipoproteínas

diaciladas (UCHIDA et al., 2013). No entanto, o papel de TLR2 ainda não é bem elucidado. Love et al. (2010) realizaram estudo com infecção de células HEK TLR-transfectadas e camundongos TLR2 nocaute infectados por *M. pulmonis*. Observaram que após esta infecção, os níveis de *M. pulmonis* nos pulmões dos camundongos foram elevados e houve produção de citocinas, indicando que mecanismos independentes de TLR 2 também podem estar envolvidos na resposta do hospedeiro. Um estudo utilizando as linhagens A2EN e ShEN101, de células endocervicais humanas, infectadas com *M. genitalium* também demonstrou a secreção de citocinas inflamatórias e estímulo de TLR3 (MCGOWIN et al., 2012).

Os inflamossomas são descritos como estruturas intracelulares homólogas aos TLR's na superfície celular. Tal plataforma molecular permite a reação do sistema imune inato com os sinais externos, e com o estresse celular. Assim, são capazes de iniciar uma reação inflamatória e acionar as respostas imunes inatas e adaptativas, ativando citocinas inflamatórias, como a IL-1β. A atividade do inflamossoma está diretamente relacionada à ativação e/ou repressão de diversos genes, com a ligação aos TLR's e direcionar a resposta imune inata (GUARDA; SO, 2010; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; BAKELE et al., 2014). Associando-se esta ativação aos ureaplasmas deste estudo, os genes relacionados à cascata de ativação de inflamossoma, verificou-se que o gene de NF-κB e da prostaglandina-endoperóxido sintase 2, foram super-expressos assim como o gene da interleucina 6. Não existem dados em literatura sobre o papel do inflamossoma na resposta de *U. diversum*. O fator regulador de transcrição NF-κB é ativado promovendo a expressão de proteínas de defesa do hospedeiro e de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α (JONES; WEISS, 2011). O estudo realizado por Uchida et al. (2013) demonstrou que uma fração lipoproteica de *Ureaplasma parvum* induziu a ativação de NF-κB via TLR2 em macrófagos peritoneais murinos. O gene da prostaglandina-endoperóxido sintase 2 participa da produção de uma proteína que converte o ácido araquidônico na molécula-chave na biossíntese enzimática de prostaglandina. Este gene é regulado durante a inflamação e pode atuar no útero bovino, levando ao aborto (PARENT; FORTIER, 2005). Verificou-se também a expressão aumentada alguns genes de ligantes de quimiocinas, como *CCL5, CXCL1 e CXCL3*, que estão relacionadas com a resposta inflamatória, principalmente com o recrutamento e migração celular, também no endométrio bovino (OGUEJIOFOR et al., 2015).

Nod Like Receptors (NLR's) são relacionados como iniciadores ou reguladores das vias de defesa do hospedeiro através da formação de plataformas de sinalização, os inflamossomas, que, subsequentemente, desencadeiam a ativação de caspases inflamatórias e NF-kB. Possuem papel fundamental no desenvolvimento de vias importantes na imunidade inata, e muitas vezes dão nome aos inflamossomas (FRITZ et al., 2006). Estudando-se o desenvolvimento de tumores gástricos utilizando monócitos expostos a *M. hyorhinis* verificou-se elevada produção de IL-1β e IL-18 induzida por mecanismos dependentes do inflamossoma NLRP3, "*in vitro*" e "*in vivo*" (XU et al., 2013). Verificou-se que monócitos e macrófagos infectados com *Acholeplasma laidlawii* vivos ou inativados por calor, foram capazes de promover a liberação de IL-1β pela presença de ASC citosólico, promovendo a ativação de inflamossoma. Por métodos de silenciamento gênico, observou-se que os inflamossomas NLRP3 e NLRP7 estavam relacionados com a resposta imune e que ambos estavam envolvidos com a secreção de IL-1β (HUA et al., 2015; SACHT et al., 1998). Com a melhor compreensão dos mecanismos e sinais inflamatórios, o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o controle dessas infecções torna-se facilitado, beneficiando a sanidade do rebanho bovino com a aplicação de tal resultado no diagnóstico. Os sinais inflamatórios mediam a colonização de micro-organismos e a evolução a doença (ROTTEM, 2003). A depender do nível dos sinais inflamatórios, para evitar os efeitos prejudiciais da reação inflamatória exacerbada ou colonização assintomática, os micro-organismos podem utilizar de mecanismos distintos. Por exemplo, em algumas espécies de micoplasmas foi descrita a indução da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13, ou a regulação negativa de NF-κB (ROTTEM, 2003). A regulação negativa da atividade do inflamossoma por NF-κB foi observada por GUARDA e SO (2010). Verificou-se que alguns genes relacionados à promoção da resposta imune exarcebada, como o gene de IFN-γ e ligantes de fatores de necrose tumoral, foram sub-expressos. A sinalização para ativação de TLR's mediada por lipoproteínas de micoplasmas que induziram a secreção de citocinas, ocorreu de maneira semelhante àquela que é induzida intracelularmente por LPS. Estes receptores possuem um domínio citoplasmático homólogo ao receptor de IL-1. Assim, é provável que o TLR2 ative o NF-kB e, possivelmente, outras vias pró-inflamatórias (ROTTEM, 2003).

Os resultados do presente estudo também demonstram a capacidade de *U. diversum* induzir a secreção de óxido nítrico pelos macrófagos bovinos. Tal habilidade foi dose dependente e na presença dos micro-organismos viáveis ou inativados. O mesmo foi observado durante a infecção experimental por *U. urealyticum* em sêmen humano (QUIAN et al., 2016) e em macrófagos murinos (CRUSE et al., 1998). *Ureaplasma parvum* também promoveu a secreção de iNOS em macrófagos peritoneais murinos experimentalmente infectados (UCHIDA et al., 2013). O óxido nítrico é importante na luteólise, implantação, vasodilatação decidual, e relaxamento do miométrio durante a gravidez (KAREN et al., 2014).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a presença de *U. diversum* no interior de blastocistos bovinos. Britton et al. (1987) demonstraram que, apesar detectarem estas bactérias na superfície da zona pelúcida com possível transmissão durante a transferência de embrião, ureaplasmas não causaram alterações ultra-estruturais em mórulas sob condições experimentais. Em culturas de células de oviduto, observou-se primeiramente a perda da atividade ciliar e posterior desciliação com descamação do epitélio (STALHEIM et al., 1976). De acordo com Smits et al. (1994), *U. diversum* pode alterar a integridade de células do oviduto, contribuindo na deficiência de implantação do embrião e seu desenvolvimento. A maioria dos estudos com essa mesma característica, são muito antigos e não foram capazes de demonstrar eficazmente a capacidade de invasão de blastocistos por *U. diversum* como no presente estudo. A intracelularidade de alguns molicutes é classicamente determinada pela combinação da metodologia da microscopia confocal e o teste da gentamicina. A invasão por *Ureaplasma diversum* foi observada em células Hep-2 (MARQUES et al., 2010) e espermatozoides bovinos (BUZINHANI et al., 2011). Os molicutes intracelulares geram sinais que desencadeiam alteração no citoesqueleto da célula hospedeira. Marques et al. (2010) demonstraram a invasão de *U. diversum* em células Hep-2, os micro-organismos apresentaram alta atividade de fosfolipase C, não havendo diferenças entre as cepas de referências e os isolados clínicos. O papel da sequência de sinais e mecanismos para a penetração, sobrevivência e proliferação dos micoplasmas nas células hospedeiras, bem como o envolvimento dos lipídeos de membrana na patologia das células hospedeiras, são aspectos importantes a serem estudados (ROTTEM, 2003). A invasão de micoplasmas no citoplasma de diferentes tipos celulares foi observada em diversas espécies dos *Mollicutes*. Assim temos: invasão

de células HeLa (BOROWSKY et al., 1998) e Hep-2 (BASEMAN; TULLY, 1997) por *M. penetrans*, de células HeLa por *M. genitalium* (DALLO; BASEMAN, 2000), por *M. gallisepticum* em células HeLa-229 (WINNER et al., 2000), por *M. bovis* em células mononucleares do sangue periférico de bovinos (MERWE; PRYSLIAK; PEREZ-CASAL, 2010). Os mecanismos de invasão dos molicutes são pouco elucidados na literatura. Em *M. fermentans* sugere-se a utilização da ativação de plasminogênio como fator de invasão (YAVLOVICH et al., 2001; YAVLOVICH et al., 2004). A invasão de *M. penetrans* está associada com a fosforilação da tirosina, que ativa a fosfolipase C, gerando fosfatidilinositol e diacilglicerol (ANDREEV et al., 1995). Existem evidências que *M. penetrans* estimula a fosfolipase da célula hospedeira para clivar os fosfolipídeos da própria membrana, iniciando cascata de sinalização para o processo de invasão. Para os ureaplasmas, sugere-se que a atividade da fosfolipase C promova os danos na membrana das células hospedeiras para a invasão (ROTTEM; NAOT, 1998; ANDREEV et al., 1995).

A capacidade de *U. diversum* invadir células, especialmente blastocistos bovinos neste estudo, representa melhor a influência deste micro-organismo na reprodução bovina e representa os riscos para estes animais e a sua prole. Neste estudo demonstrou-se maior ativação do TLR2 por blastocistos bovinos experimentalmente infectados por *U. diversum*. A secreção de citocinas pela ativação do TLR2 logo questiona as possíveis consequências desta resposta para o desenvolvimento embrionário. A literatura descreve a importância das citocinas na comunicação celular, sendo tais moléculas secretadas pelo embrião e pelos linfócitos do sangue periférico, macrófagos, células endometriais e do oviduto. Há ligação a receptores em células-alvo específicas e ação combinada de várias citocinas, que afetam mais de um mecanismo (SCHÄFER-SOMI, 2003). As citocinas são mediadores e importantes imunorreguladores na interface materno-fetal de mamíferos. A citocina mais relacionada é o IFN-tau, secretado pelo concepto e responsável por mecanismos relacionados à sua elongação e posterior implantação (ROBERTS et al., 2008; SHIRASUNA et al., 2012). Foi observada a indução de TNF-α, IL-1β e genes de estresse oxidativo, no co-cultivo de blastocistos com cultura primária de células de oviduto bovino após o desafio com LPS. Tal fato sugere a existência de um sistema de sinalização precoce para responder à uma infecção (IBRAHIM et al., 2015). A expressão destas citocinas inflamatórias e o aumento da expressão de NFkB são fatores que contribuem para desordens moleculares da

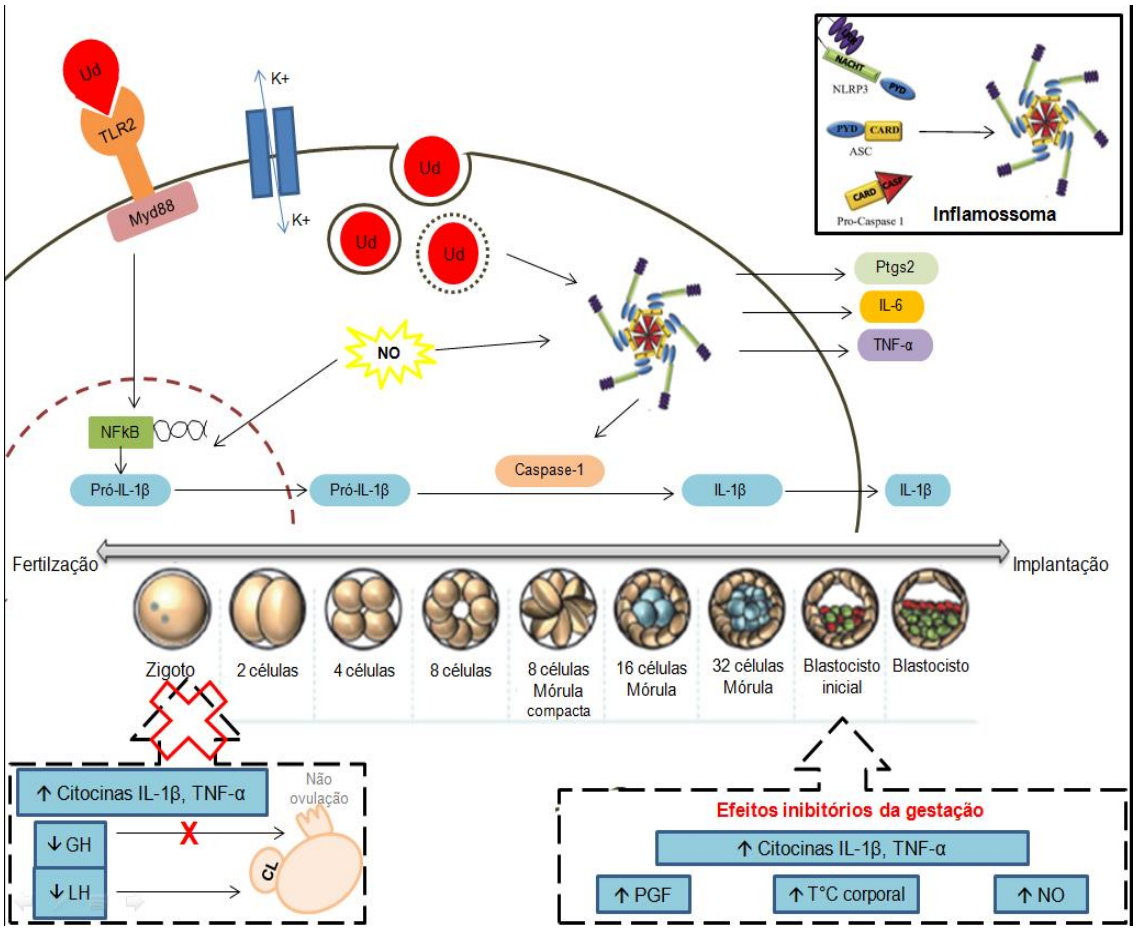
resposta imune. Este perfil de secreção pode resultar em menor qualidade e sobrevivência do embrião, e atraso no desenvolvimento embrionário (IBRAHIM et al., 2015; JACKSON; FARIN; WHISNANT, 2012). Esta regulação também pode atuar em mecanismos de tolerância imunológica materna (CORREIA-ÁLVAREZ et al., 2015; MUÑOZ et al., 2012). A importância da ativação dos TLR's 2 e 4 durante infecções em células do sistema reprodutivo de bovinos foi mencionada por diferentes estudos (LUTTGENAU et al., 2016; SHELDON et al., 2014; TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012; TURNER et al., 2014). Em camundongos, a ativação da via TLR2 e TLR2/6 em células endometriais aumentou a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como Il-1β, e reduziu as possibilidades da implantação embrionária (SANCHEZ-LOPEZ et al., 2014). Apesar da observação da indução de secreção de nitrito pelos macrófagos bovinos, o mesmo não foi observado na presente infecção experimental dos blastocistos da mesma espécie. Possivelmente esse mecanismo leve à redução de danos ao embrião favorecendo a manutenção da viabilidade celular para que o micro-organismo persista na infecção. Produtos bacterianos e mediadores endógenos de endometrite subclínica, como prostaglandinas, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e citocinas, podem afetar negativamente a qualidade do oócito. Apesar de serem afetados podem ser capazes de sofrer clivagem e fertilização, mas podem ter o potencial de desenvolvimento prejudicado. Além disso, tanto produtos bacterianos e mediadores inflamatórios endógenos podem afetar o desenvolvimento do embrião e interromper uma gravidez estabelecida (GILBERT, 2011; HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004; ORSI, 2006). No entanto, estudos mais amplos são necessários para avaliar se a ativação do sistema imune inato no ambiente uterino no momento da implantação interfere na receptividade do endométrio e reduz as chances de sucesso. Foi estudada a relação entre a artropatia fetal bovina e *U. diversum (*HIMSWORTH et al., 2009), mas esse foco seria interessante no estudo dos mecanismos relacionados ao aborto causado pela espécie.

Apesar de ainda preliminares, extrapolando os resultados encontrados para os macrófagos murinos e associando-os aos encontrados para macrófagos e blastocistos bovinos, é possível supor uma via de ativação (Figura 16). O reconhecimento das lipoproteínas de *U. diversum* pelo TLR2, desencadeia uma cascata de sinais que leva a ativação do fator de transcrição NF-κB. Assim, a forma inativa das citocinas, a exemplo de pró-IL-1β, é traduzida e exportada para o

citoplasma. A invasão ou fagocitose de *U. diversum* pode levar ao reconhecimento intracelular por Nod Like Receptors (NLRP3), que associam-se às moléculas adaptadoras (ASC e pró-caspase 1) para montarem o inflamossoma. O processo infeccioso também leva à produção de óxido nítrico, que estimula a ação de NF-κB assim como do inflamossoma. Esta plataforma molecular leva, dentre outros mecanismos, à secreção da forma ativa da caspase 1 que converte as citocinas (IL-1β, por exemplo) na sua forma ativa para ser secretada para o meio extracelular. Além disso, também leva à ativação de genes como o da prostaglandina endoperóxido sintase 2 (*ptgs2*), que leva a síntese de prostaglandina. A associação desses fatores no ambiente uterino interfere, principalmente, no processo de implantação do blastocisto, inibindo a gestação. Por outro lado, este ambiente inflamatório gerado pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico reduzem GnRH e LH levando a não ovulação. A luteólise causada pelo aumento de prostaglandina,pode levar ao não reconhecimento da gestação.

Nos resultados do presente estudo, foi observado que *U. diversum* é capaz de promover resposta inflamatória em macrófagos peritoneais murinos, macrófagos e blastocistos bovinos. Este resultado é consistente com os estudos de outros micoplasmas que descrevem a presença de um componente celular de superfície capaz de induzir uma resposta desse tipo. Embora este componente esteja possivelmente associado com esta resposta, o mecanismo ativador ainda não está claro, mas esses resultados demonstram o envolvimento da ativação do TLR2 e a secreção de IL-1β e TNF-α. Os resultados deste estudo, associados ao recente sequenciamento do genoma de *U. diversum*, permite avanço na compreensão da biologia molecular de infecções por micoplasma. Devido à falta de terapêuticas e vacinas eficazes contra micoplasmoses animais, as doenças continuam a ser um problema significativo para a saúde animal, bem como a pecuária com importantes consequências socio-econômicas no mundo. Dessa maneira, fomenta-se a discussão da importância e relevância das micoplasmoses, especialmente por *U. diversum*, na reprodução e bovinocultura no cenário brasileiro.

Figura 16 - Representação hipotética da influência de *U. diversum* na implantação embrionária e falha na gestação.



Legenda: Possíveis vias pelas quais a infecção por *U. diversum* pode reduzir a sobrevivência embrionária ou interferir no processo reprodutivo em bovinos. De acordo com o modelo proposto, a principal causa de mortalidade embrionária associada com a infecção por este micro-organismo é o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (quer produzidas pelos macrófagos ou pelo blastocisto) modulando a função reprodutiva em bovinos em vários níveis.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Ureaplasma diversum* promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos e bovinos e em blastocistos bovinos, podendo este ser um mecanismo relacionado aos danos provocados pela infecção ou participação de uma modulação imune que permita a persistência intracelular da espécie.
- O reconhecimento da infecção por *Ureaplasma diversum* ocorre via TLR2 em macrófagos murinos e bovinos e em blastocistos bovinos, e ativa vias de inflamossoma, de modo que a infecção desencadeia uma cascata de outros sinais inflamatórios que podem causar danos no hospedeiro se não forem moduladas.
- A secreção de nitrito foi estimulada em macrófagos murinos e bovinos na presença de *Ureaplasma diversum*, mas não em blastocistos bovinos, o que está de acordo com o perfil de resposta inflamatória associado à infecção e permite inferir que os blastocistos terão mais chance de implantação e o micro-organismo poderá persistir na infecção.
- *Ureaplasma diversum* invade blastocistos bovinos, sem causar efeitos citopáticos, demonstrando que, como consequência dessa invasão, este micro-organismo pode persistir infectando tais células, impedindo a implantação embrionária ou causando danos futuros ao feto.

REFERÊNCIAS*

AGNEW, L. L.; COLDITZ, I. G. Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.,** v. 123, n. 3-4, p. 197-204, 2008.

ALLAM, A. B. et al. Immune profiling of BALB/C and C57BL/6 mice reveals a correlation between *Ureaplasma parvum*-Induced fetal inflammatory response syndrome-like pathology and increased placental expression of TLR2 and CD14. **Am. J. Reprod. Immunol.,** v. 71, n. 3, p. 241-51, 2014.

ALMEIDA, R. A.; WANNEMUEHLER, M. J.; ROSENBUSCH, R. F. Interaction of *Mycoplasma dispar* with bovine alveolar macrophages. **Infect. Immun.,** v. 60, n. 7, p. 2914-9, 1992.

AMARAL, W. N. **Soroprevalência de *mycoplasma* em pacientes com esterilidade feminina.** 2003. 79p. Dissertação (Mestrado) - Instituto De Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goias, Goiânia, 2003.

AMIRMOZAFARI, N. et al. Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. **Saudi. Med. J.,** v. 30, n. 11, p. 1401-5, 2009.

AMORIM, A. T. et al. Apoptosis in HEp-2 cells infected with *Ureaplasma diversum*. **Biol. Res.,** v. 47, p. 38, 2014.

ANDRADE, J. R. A. et al. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.**, Minas Gerais. n.57, 6p, 2005.

ANDREEV, J. et al. Invasion of HeLa cells by *Mycoplasma penetrans* and the induction of tyrosine phosphorylation of a 145-kDa host cell protein. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 132, n. 3, p. 189-94, 1995.

ANTONIASSI, N. A. B. et al. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. **Arq. do Inst. Biol.** 69**:** 69-72 p. Biológico, São Paulo, v.69, n.2, p.69-72, 2007.

ATAEE, R. A. et al. Simultaneous Detection of *Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma arthritidis* in Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis by Multiplex PCR. **Arch. Iran. Med.,** v. 18, n. 6, p. 345-50, 2015.

BAKELE, M. et al. Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. **J. Biol. Chem.,** v. 289, n. 8, p. 5320-9, 2014.

BALABANOV, D. N. et al. The comparison of mycoplasma detection methods in the urogenital tract infection. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, n. 4, p. 82-5, 2006.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASEMAN, J. B. et al. Interplay between mycoplasmas and host target cells. **Microb. Pathog.,** v. 19, n. 2, p. 105-16, 1995.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.

BEAMAN, K. D.; POLLACK, J. D. Synthesis of adenylate nucleotides by *Mollicutes (mycoplasmas)*. **J. Gen. Microbiol.,** v. 129, n. 10, p. 3103-10, 1983.

BELLOY, L. et al. Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae.* **Microbiology,** v. 149, n. Pt 1, p. 185-93, 2003.

BERGEY, D. H. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: _____2. ed. **Manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, v. 4, 721 p. 2010.

BEY, I. **Les ureaplasmes en pathologie bovine: Epidemiologie, diagnostic et mesures de controle.** 2006. 90 p. Universite Claude-Bernard. Lyon. França. [THESE]. v.I, n.19, 2006.

BIELANSKI, A. et al. Isolation of *Mycoplasma bovis* from intact and microinjected preimplantation bovine embryos washed or treated with trypsin or antibiotics. **J. In Vitro Fert. Embryo Transf.,** v. 6, n. 4, p. 236-41, 1989.

BIELANSKI, A.; DEVENISH, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in semen on fertilization and association with in vitro produced morula and blastocyst stage embryos. **Theriogenology,** v. 53, n. 6, p. 1213-23, 2000.

BOESEN, T. et al. Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. **Protein. Sci.,** v. 10, n. 12, p. 2577-86, 2001.

BRITTON, A. P. et al. Protein A gold identification of ureaplasmas on the bovine zona pellucida. **Can. J. Vet. Res.,** v. 53, n. 2, p. 172-5, 1989.

BRITTON, A. P. et al. In vitro exposure of bovine morulae to *Ureaplasma diversum*. **Can. J. Vet. Res.,** v. 51, n. 2, p. 198-203, 1987.

BROMFIELD, J. J. et al. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Uterine infection: linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. **J. Anim. Sci.,** v. 93, n. 5, p. 2021-33, 2015.

BROWN, D. R.; WHITCOMB, R. F.; BRADBURY, J. M. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,** v. 57, n. Pt 11, p. 2703-19, 2007.

BROWNING, G. F. et al. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. **Vet. Microbiol.,** v. 153, n. 1-2, p. 44-50, 2011.

BÜRKI, S.; FREY, J.; PILO, P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. **Vet. Microbiol.,** v. 179, n. 1-2, p. 15-22, 2015.

BUZINHANI, M. et al. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozoids. **BMC Res. Notes,** v. 4, p. 455, 2011.

BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 59:1368-1375. 2007.

CARDOSO, M. V. et al. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. **Vet. Microbiol.,** v. 72, n. 3-4, p. 241-50, 2000.

CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros - Artigo de revisão. **Arq. do Inst. Biol.** São Paulo. v.71, n.2, p.257-265, 2004.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. **Trends Microbiol.,** v. 7, n. 12, p. 493-9, 1999.

CHANG, H. Y. et al. Processing is required for a fully functional protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding and cytadherence. **J. Bacteriol.,** v. 193, n. 20, p. 5841-6, 2011.

CHELMONSKA-SOYTA, A. et al. Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. **Can. J. Vet. Res.,** v. 58, n. 4, p. 275-80, 1994.

CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends Microbiol.,** v. 21, n. 4, p. 196-203, 2013.

Conclusions of the Research Subcommittee of the International Embryo Transfer Society (IETS) Import/Export Committee. Denver (United States of America), 14 January 1992. **Rev. Sci. Tech.,** v. 11, n. 3, p. 937-42, 1992.

CORREIA-ÁLVAREZ, E. et al. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo. **J. Reprod. Immunol.,** v. 110, p. 1-13, 2015.

CROUSE, D. T. et al. Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line. **Pediatr. Res.,** v. 44, n. 5, p. 785-90, 1998.

DALLO, S. F.; BASEMAN, J. B. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. **Microb. Pathog.,** v. 29, n. 5, p. 301-9, 2000.

DAMTE, D. et al. Sonicated Protein Fractions of *Mycoplasma hyopneumoniae* Induce Inflammatory Responses and Differential Gene Expression in a Murine Alveolar Macrophage Cell Line. **J. Microbiol. Biotechnol.,** v. 25, n. 12, p. 2153-9, 2015.

D'ANGELO, A. R. et al. Effects of immune serum on macrophage cell cultures infected with *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* small colony: morphological analysis by scanning electron microscopy. **Vet. Ital.,** v. 46, n. 4, p. 389-404, 2010.

DAVID, Y.; BROWNING, G. F.; WISE, K. S. Genetic mechanisms of surface variation. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Eds.). **Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas**. New York, USA: Kluwer academic, 2002.

DEL FAVA, C. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semintensivo. **Arq. do Inst. Biol.** São Paulo. v.70, n.1, p.25-33, 2003.

DIAS, R.O.S. Ureaplasma e a reprodução animal. **MilkPoint**. Campinas, out. 2002. Disponível em: <http:// milkpoint.com.br/?actA=7&areaID=61&secaoID=184&noticiaID=16709>. Acesso em: 05 set. 2016.

DIEDERSHAGEN, M. et al. *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAM) displays DNase activity. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v. 49, n. 2, p. 266-71, 2007.

DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; PALMER, N. C. Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. **Can. J. Comp. Med.,** v. 44, n. 3, p. 252-8, 1980.

DORNELES, E. M.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A. P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. **Vet. Res.,** v. 46, p. 76, 2015.

DYBVIG, K.; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.,** v. 50, p. 25-57, 1996.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M.; STEWART, R. B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. Haemophilus somnus, Mycoplasma spp. and Ureaplasma spp., Chlamydia; Phathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. **Vet. Bull**., v.62, p.887-910, 1992.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J. Comp. Pathol.,** v. 126, n. 2-3, p. 79-94, 2002.

ESPOSITO, G. et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 144, n. 3-4, p. 60-71, 2014.

FERREIRA, G. B.; FERNANDES, H.D. Parâmetros Genéticos para Características Produtivas em Bovinos da Raça Holandesa no Estado de Goiás. **Rev. Bras. de Zoot.** Viçosa. v.29, n.2, p.421-426, 2000.

FOX, L. K. et al. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma sp*. in milk. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health,** v. 50, n. 5, p. 235-40, 2003.

FRITZ, J. H. et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat. Immunol.,** v. 7, n. 12, p. 1250-7, 2006.

GAMBARINI, M. L. et al. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: role of *Mycoplasma spp., Ureaplasma diversum* and BHV-1. **Trop. Anim. Health Prod.,** v. 41, n. 7, p. 1421-6, 2009.

GARCIA, J. et al. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. **J. Biol. Chem.,** v. 273, n. 51, p. 34391-8, 1998.

GILBERT, R. O. The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle. **Reprod. Fertil. Dev.,** v. 24, n. 1, p. 252-7, 2011.

GONDAIRA, S. et al. Cytokine mRNA profiling and the proliferative response of bovine peripheral blood mononuclear cells to *Mycoplasma bovis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.,** v. 165, n. 1-2, p. 45-53, 2015.

GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.,** v. 19, n. 1, p. 199-221, 2003.

GRAPHPAD-PRISM. GraphPad. Version 5.0. San Diego, CA-USA, 2010. Software. Disponível em: < http://www.graphpad.com/ >. Acesso em 25 ago. 2016.

GUARDA, G.; SO, A. Regulation of inflammasome activity. **Immunology,** v. 130, n. 3, p. 329-36, 2010.

HANKE, M. L.; KIELIAN, T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. **Clin. Sci. (Lond),** v. 121, n. 9, p. 367-87, 2011.

HANSEN, P. J.; SOTO, P.; NATZKE, R. P. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **Am. J. Reprod. Immunol.,** v. 51, n. 4, p. 294-301, 2004.

HEGDE, S. et al. Sheep primary cells as in vitro models to investigate *Mycoplasma agalactiae* host cell interactions. **Pathog. Dis.,** v. 73, n. 7, 2015.

HEIDEGGER, S. et al. *Mycoplasma hyorhinis*-Contaminated Cell Lines Activate Primary Innate Immune Cells via a Protease-Sensitive Factor. **PLoS One,** v. 10, n. 11, p. e0142523, 2015.

HIMSWORTH, C. G. et al. Destructive polyarthropathy in aborted bovine fetuses: a possible association with *Ureaplasma diversum* infection? **Vet. Pathol.,** v. 46, n. 2, p. 269-72, 2009.

HOBSON, N.; CHOUSALKAR, K. K.; CHENOWETH, P. J. *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: its detection and potential effects. **Aust. Vet. J,** v. 91, n. 11, p. 469-73, 2013.

HORCAJO, P. et al. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. **Parasite Immunol.**, 2016.

HUA, K. F. et al. Cyclooxygenase-2 regulates NLRP3 inflammasome-derived IL-1β production. **J. Cell. Physiol.,** v. 230, n. 4, p. 863-74, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística de Produção Pecuária.** Produção Pecuária Municipal. Banco de dados. p. 6–7, 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=1>. Acesso em: 05 set. 2016.

IBRAHIM, S. et al. Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory micrornas in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide: implication for early embryonic development. **PLoS One,** v. 10, n. 3, p. e0119388, 2015.

INOUE, R. et al. Nucleic acids of Enterococcus faecalis strain EC-12 are potent Toll-like receptor 7 and 9 ligands inducing interleukin-12 production from murine splenocytes and murine macrophage cell line J774.1. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.,** v. 61, n. 1, p. 94-102, 2011.

JACKSON, L. R.; FARIN, C. E.; WHISNANT, S. Tumor necrosis factor alpha inhibits in vitro bovine embryo development through a prostaglandin mediated mechanism. **J. Anim. Sci. Biotechnol.,** v. 3, n. 1, p. 7, 2012.

JONES, C. L.; WEISS, D. S. TLR2 signaling contributes to rapid inflammasome activation during *F. novicida* infection. **PLoS One,** v. 6, n. 6, p. e20609, 2011.

JUAREZ, E. et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. **Respir. Res.,** v. 11, p. 2, 2010.

KACEROVSKY, M. et al. Amniotic fluid protein profiles of intraamniotic inflammatory response to *Ureaplasma spp*. and other bacteria. **PLoS One,** v. 8, n. 3, p. e60399, 2013.

KAREN, A. et al. Relationship of progesterone, bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 and nitric oxide with late embryonic and early fetal mortalities in dairy cows. **J. Reprod. Dev.,** v. 60, n. 2, p. 162-7, 2014.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.,** v. 11, n. 5, p. 373-84, 2010.

KHIARI, A. B.; MARDASSI, B. B. Characterization of the antigenic and functional domains of a *Mycoplasma synoviae* variant vlhA gene. **Vet. Microbiol.,** v. 156, n. 3-4, p. 322-9, 2012.

KUNDSIN, R. B.; PARRENO, A.; POULIN, S. Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of *Ureaplasma urealyticum* from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.,** v. 8, n. 4, p. 445-53, 1978.

LANYON, S. R. et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **Vet. J.,** v. 199, n. 2, p. 201-9, 2014.

LARSEN, B.; HWANG, J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.,** v. 2010, 2010.

LEWANDOWSKA-SABAT, A. M. et al. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus* in vitro. **BMC Genomics,** v. 14, p. 891, 2013.

LI, Y. H. et al. *Ureaplasma urealyticum*-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. **Pediatr. Res.,** v. 48, n. 1, p. 114-9, 2000.

LI, Y. H. et al. Activation of nuclear factor kappaB and induction of inducible nitric oxide synthase by *Ureaplasma urealyticum* in macrophages. **Infect. Immun.,** v. 68, n. 12, p. 7087-93, 2000.

LOVE, W. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a major role in innate resistance in the lung against murine *Mycoplasma*. **PLoS One,** v. 5, n. 5, p. e10739, 2010.

LÜTTGENAU, J. et al. LPS-mediated effects and spatio-temporal expression of TLR2 and TLR4 in the bovine corpus luteum. **Reproduction,** v. 151, n. 4, p. 391-9, 2016.

LYSNYANSKY, I. et al. Identification of *Mycoplasma bovigenitalium* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. **Vet. Rec.,** v. 165, n. 11, p. 319-22, 2009.

MARQUES, L. M. et al. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum*. **Vet. Microbiol.,** v. 167, n. 3-4, p. 670-4, 2013.

MARQUES, L. M. **Estudo da variabilidade genética e dos fatores de virulência de isolados de *Ureaplasma diversum*.** 2009. Tese (Doutorado). São Paulo: USP, 2009.

MARQUES, L. M. et al. Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782. **Genome Announc.,** v. 3, n. 2, 2015.

MARQUES, L. M. et al. Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. **BMC Microbiol.,** v. 10, p. 83, 2010.

MARQUES, L. M. et al. *Ureaplasma diversum* Genome Provides New Insights about the Interaction of the Surface Molecules of This Bacterium with the Host. **PLoS One,** v. 11, n. 9, p. e0161926, 2016.

MCGOWIN, C. L. et al. Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. **Infect. Immun.,** v. 80, n. 11, p. 3842-9, 2012.

MILLER, R. et al. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.,** v. 10, n. 3, p. 479-90, 1994.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Bovinos e bubalinos.** Banco de dados. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 05 set. 2016.

MUÑOZ, M. et al. Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus. **J. Proteome Res.,** v. 11, n. 2, p. 751-66, 2012.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R.L. Patologias do útero gestante. In: _____. - **Patologia da reprodução dos animais domésticos.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 70-89.

NASCIMENTO, M. G. F. et al. Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. **Acta. Scien. Vet.**, n.33, p.195-199. 2005.

NICHOLAS, R. A.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Res. Vet. Sci,** v. 74, n. 2, p. 105-12, 2003.

NICHOLAS, R. A.; AYLING, R. D.; MCAULIFFE, L. Vaccines for *Mycoplasma* diseases in animals and man. **J. Comp. Pathol.,** v. 140, n. 2-3, p. 85-96, 2009.

NICHOLAS, R.A.J. et al. *Mycoplasmas* in adult cattle: Bugs worth bothering about? **Ir. Vet. J.,** v.59, n.10, 2006.

OGUEJIOFOR, C. F. et al. Global transcriptomic profiling of bovine endometrial immune response in vitro. I. Effect of lipopolysaccharide on innate immunity. **Biol. Reprod.,** v. 93, n. 4, p. 100, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, B. D. et al. *Ureaplasma diversum* isolation from vaginal mucus of repeat breeders dairy cows in Alagoas state – Brazil. **Arch. of Vet. Scie**. 10:151-156. 2005.

OLSON, L. D. et al. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism: a 13C-NMR study. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 108, n. 1, p. 47-52, 1993.

ORSI, N. M. Embryotoxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos in vitro. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 91, n. 3-4, p. 225-36, 2006.

PARENT, J.; FORTIER, M. A. Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. **Biol. Reprod.,** v. 73, n. 1, p. 36-44, 2005.

PELTIER, M. R. et al. Characterization of the macrophage-stimulating activity from *Ureaplasma urealyticum*. **Am. J. Reprod. Immunol.,** v. 57, n. 3, p. 186-92, 2007.

PITCHER, D. G.; NICHOLAS, R. A. *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction? **Vet. J.,** v. 170, n. 3, p. 300-6, 2005.

POTTER, T. J. et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. **Theriogenology,** v. 74, n. 1, p. 127-34, 2010.

QIAN, L. et al. Effects of *Ureaplasma urealyticum* Infection on Sperm Quality and Concentrations of Nitric Oxide and Cytokine in the Semen of Infertile Males. **Am. J. Reprod. Immunol.,** v. 75, n. 6, p. 605-8, 2016.

RAO, X. et al. An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostat Bioinforma Biomath,** v. 3, n. 3, p. 71-85, 2013.

RAWADI, G.; ROMAN-ROMAN, S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. **Infect. Immun.,** v. 64, n. 2, p. 637-43, 1996.

RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. **Biosci. Rep.,** v. 19, n. 5, p. 367-72, 1999.

RAZIN, S**.** Mycoplasmas: general concepts. In: _____. **Medical microbiology.** San Diego: Academic Press, 2004. p. 425–474. 2 v.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. **Biologicals,** v. 38, n. 2, p. 183-90, 2010.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Mycoplasma adhesion. **J. Gen. Microbiol.,** v. 138, n. 3, p. 407-22, 1992.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** v. 62, n. 4, p. 1094-156, 1998.

ROBERTS, R. M. et al. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. **Semin. Cell. Dev. Biol.,** v. 19, n. 2, p. 170-7, 2008.

ROMERO-ARROYO, C. E. et al. *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 is required for cytadherence and associated with proper cell development. **J. Bacteriol.,** v. 181, n. 4, p. 1079-87, 1999.

ROSENGARTEN, R. et al. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. **Int. J. Med. Microbiol.,** v. 290, n. 1, p. 15-25, 2000.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.,** v. 83, n. 2, p. 417-32, 2003.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends Microbiol.,** v. 6, n. 11, p. 436-40, 1998.

RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W., ROSENBUSCH, R. F., LAUERMAN, L. H. (Eds.), **Mycoplasmosis in Animals:** laboratory diagnosis**.** Iowa: Iowa State University Press, Ames, 1994. p. 141-144. 1994.

SACHT, G. et al. Activation of nuclear factor-kappaB in macrophages by mycoplasmal lipopeptides. **Eur. J. Immunol.,** v. 28, n. 12, p. 4207-12, 1998.

SANCHEZ-LOPEZ, J. A. et al. Local activation of uterine Toll-like receptor 2 and 2/6 decreases embryo implantation and affects uterine receptivity in mice. **Biol. Reprod.,** v. 90, n. 4, p. 87, 2014.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 75, n. 1-2, p. 73-94, 2003.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell,** v. 140, n. 6, p. 821-32, 2010.

SHELDON, I. M. et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction,** v. 148, n. 3, p. R41-51, 2014.

SHELDON, I. M. Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. **Reprod. Fertil. Dev.,** v. 27, n. 1, p. 72-81, 2014.

SHIO, M. T. et al. Coexpression of TLR2 or TLR4 with HLA-DR potentiates the superantigenic activities of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen. **J. Immunol.,** v. 192, n. 6, p. 2543-50, 2014.

SHIRASUNA, K. et al. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. **J. Reprod. Dev.,** v. 58, n. 1, p. 84-90, 2012.

SILVA, J. R. et al. Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF-α mediated womb inflammation in mice. **An. Acad. Bras. Cienc.,** v. 88, p. 643-52, 2016. Suplemento 1.

SMITS, B. et al. Effects of *Ureaplasma diversum* on bovine oviductal explants: quantitative measurement using a calmodulin assay. **Can. J. Vet. Res.,** v. 58, n. 2, p. 114-21, 1994.

STALHEIM, O. H.; PROCTOR, S. J.; GALLAGHER, J. E. Growth and effects of ureaplasmas (T mycoplasmas) in bovine oviductal organ cultures. **Infect. Immun.,** v. 13, n. 3, p. 915-25, 1976.

STERNER-KOCK, A. et al. Morphological characterization and immunohistochemical detection of the proinflammatory cytokines IL-1β, IL-17A, and TNF-α in lung lesions associated with contagious bovine pleuropneumonia. **Trop. Anim. Health Prod.,** v. 48, n. 3, p. 569-76, 2016.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. **Theriogenology,** v. 53, n. 1, p. 85-94, 2000.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.,** v. 169, n. 5, p. 1543-55, 1989.

SVENSTRUP, H. F. et al. Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. **J. Med. Microbiol.,** v. 51, n. 5, p. 361-73, 2002.

TAYLOR-ROBINSON, D. Serological identification of ureaplasmas from humans, In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.) **Methods in mycoplasmology.** New York: Academic Press, 1983. p. 57-63. 2 v.

TULLY, J. G. Current status of the mollicute flora of humans. **Clin. Infect. Dis.,** v. 17, p. S2-9, 1993. Suplemento 1.

TURNER, M. L. et al. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. **Endocrinology,** v. 155, n. 4, p. 1453-65, 2014.

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. **Reprod. Domest. Anim.,** v. 47, p. 402-9, 2012. Suplemento 4.

UCHIDA, K. et al. Effects of *Ureaplasma parvum* lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice. **J. Reprod. Immunol.,** v. 100, n. 2, p. 118-27, 2013.

VAN DER MERWE, J.; PRYSLIAK, T.; PEREZ-CASAL, J. Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. **Infect. Immun.,** v. 78, n. 11, p. 4570-8, 2010.

VISCARDI, R. M. Ureaplasma species: role in neonatal morbidities and outcomes. **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.,** v. 99, n. 1, p. F87-92, 2014.

WAKAYO, B. U.; BRAR, P. S.; PRABHAKAR, S. Review on mechanisms of dairy summer infertility and implications for hormonal intervention. **Open Vet. J.,** v. 5, n. 1, p. 6-10, 2015.

WANG, Y. et al. *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1β production through the NF-κB pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. **Dev. Comp. Immunol.,** v. 55, p. 111-8, 2016.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infect. Immun.,** v. 68, n. 7, p. 4238-44, 2000.

WU, H. N. et al. "Mycoplasmal antigen modulation," a novel surface variation suggested for a lipoprotein specifically localized on Mycoplasma mobile. **Curr. Microbiol.,** v. 64, n. 5, p. 433-40, 2012.

XIONG, Q. et al. The functions of the variable lipoprotein family of *Mycoplasma hyorhinis* in adherence to host cells. **Vet. Microbiol.,** v. 186, p. 82-9, 2016.

XU, Y. et al. *Mycoplasma hyorhinis* activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells. **PLoS One,** v. 8, n. 11, p. e77955, 2013.

YAVLOVICH, A.; HIGAZI, A. A.; ROTTEM, S. Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. **Infect. Immun.,** v. 69, n. 4, p. 1977-82, 2001.

YAVLOVICH, A.; TARSHIS, M.; ROTTEM, S. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 233, n. 2, p. 241-6, 2004.

YOU, X. X.; ZENG, Y. H.; WU, Y. M. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.,** v. 7, n. 5, p. 342-50, 2006.

ZBINDEN, C. et al. The immune response of bovine mammary epithelial cells to live or heat-inactivated *Mycoplasma bovis*. **Vet. Microbiol.,** v. 179, n. 3-4, p. 336-40, 2015.

ZUO, L. L.; WU, Y. M.; YOU, X. X. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.,** v. 10, n. 1, p. 67-76, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Genes sobre-expressos de vias de inflamossoma após a infecção com as amostras GOTA e ATCC 49782 em comparação ao controle (apenas células). ANOVA, p<0,05

Genes Over-Expressed					
Group 1 (GOTA) vs. Control Group			**Group 2 (ATCC 49782) vs. Control Group**		
Gene	**FoldRegulation**	**p-value**	**Gene**	**FoldRegulation**	**p-value**
Ccl5	25,2346	**0,005447**	*Ccl5*	42,4394	0,095288
Cxcl1	15,6418	**0,01469**	*Cxcl1*	28,7868	**0,018337**
Cxcl3	24,6583	**0,000359**	*Cxcl3*	42,049	**0,017954**
Ikbkg	5,1124	0,214988	*Il6*	11,5035	**0,024541**
Il6	16,6872	0,120108	*Nfkbib*	5,859	**0,042943**
Irf1	5,1361	0,27365	*Ptgs2*	7,485	**0,0266**
Nfkbib	19,2573	**0,026702**			
Nlrc5	4,7262	0,295952			
Ptgs2	6,7458	**0,022047**			

APÊNDICE B - Genes sub-expressos de vias de inflamossoma após a infecção com as amostras GOTA e ATCC 49782 em comparação ao controle (apenas células). ANOVA, p<0,05

Genes Under-Expressed					
Group 1 (GOTA) vs. Control Group			**Group 2 (ATCC 49782) vs. Control Group**		
Gene	**FoldRegulation**	**p-value**	**Gene**	**FoldRegulation**	**p-value**
Bcl2l1	-4,2066	0,150844	*Casp12*	-6,2448	0,053934
Casp12	-4,7767	0,121297	*Cd40lg*	-5,0374	**0,020369**
Cd40lg	-10,6738	**0,012011**	*Ifng*	-4,9565	0,060035
Ctsb	-4,1487	0,054979	*Il12a*	-4,7767	**0,039879**
Ifng	-387,8442	**0,030337**	*Il33*	-5,5507	**0,03309**
Il12a	-25,0372	**0,018668**	*Irf4*	-10,4541	**0,022703**
Il33	-58,4582	**0,017359**	*Mefv*	-4,2359	0,215487
Irf4	-172,3662	**0,015954**	*Naip1*	-4,968	**0,05182**
Mefv	-4,3651	0,210176	*Nlrp4b*	-5,4365	**0,033858**
Naip1	-4,1391	0,08777	*Nlrp4e*	-5,7998	0,052984
Nlrp4b	-13,1106	**0,020541**	*Nlrp5*	-8,2783	**0,025521**
Nlrp4e	-41,72	**0,030888**	*Nlrp9b*	-5,5507	**0,031347**
Nlrp5	-396,9096	**0,016417**	*Ripk2*	-4,3651	0,050317
Nlrp9b	-266,7479	**0,015705**	*Tnfsf11*	-6,5553	**0,016208**
Tnfsf11	-96,961	**0,00828**	*Tnfsf4*	-4,9565	**0,027686**
Tnfsf4	-21,4961	**0,012871**	*Txnip*	-5,1077	**0,023798**

APÊNDICE C - Genes avaliados pelo kit Mouse Inflammasomes RT² Profiler™ qPCR *Array*

(continua)

GeneBank	Symbol	Description
NM_001013779	Aim2	Absent in melanoma 2
NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
NM_009743	Bcl2l1	Bcl2-like 1
NM_007465	Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2
NM_007464	Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3
NM_001163138	Card6	Caspase recruitment domain family, member 6
NM_009807	Casp1	Caspase 1
NM_009808	Casp12	Caspase 12
NM_009812	Casp8	Caspase 8
NM_011331	Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
NM_013653	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
NM_013654	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
NM_011616	Cd40lg	CD40 ligand
NM_009805	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
NM_007700	Chuk	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
NM_007575	Ciita	Class II transactivator
NM_007798	Ctsb	Cathepsin B
NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
NM_203320	Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
NM_010175	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
NM_010480	Hsp90aa1	Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1
NM_011631	Hsp90b1	Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1
NM_010510	Ifnb1	Interferon beta 1, fibroblast
NM_008337	Ifng	Interferon gamma
NM_010546	Ikbkb	Inhibitor of kappaB kinase beta
NM_010547	Ikbkg	Inhibitor of kappaB kinase gamma
NM_008351	Il12a	Interleukin 12A
NM_008352	Il12b	Interleukin 12B
NM_008360	Il18	Interleukin 18
NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta
NM_133775	Il33	Interleukin 33
NM_031168	Il6	Interleukin 6
NM_008363	Irak1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
NM_008390	Irf1	Interferon regulatory factor 1
NM_016849	Irf3	Interferon regulatory factor 3
NM_013674	Irf4	Interferon regulatory factor 4
NM_172688	Map3k7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
NM_011949	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1
NM_011161	Mapk11	Mitogen-activated protein kinase 11
NM_013871	Mapk12	Mitogen-activated protein kinase 12
NM_011950	Mapk13	Mitogen-activated protein kinase 13
NM_011952	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3
NM_016700	Mapk8	Mitogen-activated protein kinase 8
NM_016961	Mapk9	Mitogen-activated protein kinase 9
NM_019453	Mefv	Mediterranean fever

NM_010851	Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NM_008670	Naip1	NLR family, apoptosis inhibitory protein 1
NM_010870	Naip5	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5
NM_008689	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105
NM_010907	Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NM_010908	Nfkbib	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
NM_001033367	Nlrc4	NLR family, CARD domain containing 4
NM_001033207	Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5
NM_001033431	Nlrp12	NLR family, pyrin domain containing 12
NM_001004142	Nlrp1a	NLR family, pyrin domain containing 1A
NM_145827	Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3
NM_172481	Nlrp4b	NLR family, pyrin domain containing 4B
NM_001004194	Nlrp4e	NLR family, pyrin domain containing 4E
NM_011860	Nlrp5	NLR family, pyrin domain containing 5
NM_001081389	Nlrp6	NLR family, pyrin domain containing 6
NM_194058	Nlrp9b	NLR family, pyrin domain containing 9B
NM_178420	Nlrx1	NLR family member X1
NM_172729	Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NM_145857	Nod2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
NM_011027	P2rx7	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
NM_019482	Panx1	Pannexin 1
NM_011063	Pea15a	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15A
NM_011193	Pstpip1	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1
NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
NM_023258	Pycard	PYD and CARD domain containing
NM_009045	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
NM_138952	Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2
NM_011973	Mok	Serine/threonine kinase 30
NM_026474	Sugt1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)
NM_025609	Tab1	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1
NM_138667	Tab2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2
NM_054096	Tirap	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein
NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor
NM_011613	Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
NM_019418	Tnfsf14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
NM_009452	Tnfsf4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
NM_009424	Traf6	Tnf receptor-associated factor 6
NM_023719	Txnip	Thioredoxin interacting protein
NM_009688	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis
NM_007393	Actb	Actin, beta
NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1