PRISCILLA MEGUMI UENO

***Mycoplasma genitalium* : curva de
crescimento e interação com células
humanas de cérvix (HeLa) e endometriais
(EM42)**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

São Paulo
2008

RESUMO

UENO, P.M. ***Mycoplasma genitalium*: curva de crescimento e interação com células humanas de cérvix (HeLa) e endometriais (EM42)**. 154 f. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mycoplasma (M.) genitalium é um importante agente de doença sexualmente transmissível, sendo responsável por uma série de desordens do trato urogenital humano. Apesar de sequenciado, existem poucos estudos sobre suas propriedades biológicas e fatores envolvidos no crescimento. Um dos principais desafios deste e outros mollicutes de importância médica é a compreensão das infecções crônicas que podem persistir mesmo após tratamento antibiótico adequado. A aderência do micoplasma é um dos principais fatores de virulência na sua patogenicidade e conseqüente colonização nas células hospedeiras. Neste estudo, obte-se a curva de crescimento da cepas de *M. genitalium* G37 e estirpe 1019V, utilizando-se da dosagem proteica (BCA), densidade óptica (OD₆₀₀) e PCR em tempo real. A cepa referencial G37 é de alta passagem e foi isolada de homens e a 1019V é de baixa passagem, sendo recentemente isolada de amostra clínica de cérvix humana. Utilizando-se da fase logarítmica obtida pela curva, comparou-se a dinâmica de interação destas cepas na célula epitelial de carcinoma de cérvix humana (HeLa) e na célula endometrial humana (EM42), em diferentes intervalos de tempo com auxílio de microscopia confocal. Apesar de estas cepas divergirem na seqüência dos genes relacionados a aderência houve poucas variações entre as curvas de crescimento. A aderência e a invasão de *M. genitalium* nas células não fagocíticas confirmou os dados de literatura. Entretanto, após 30 minutos de contato com as células, detectou-se o antígeno de aderência de ambas as cepas na região intranuclear Este achado indica uma nova característica desta espécie ainda não conhecida entre os mollicutes.

Palavras-chave: *Mycoplasma genitalium*; Curva de crescimento; Aderência; Invasão citoplasmática; Invasão nuclear.

ABSTRACT

UENO, P.M. ***Mycoplasma genitalium*: growth curve and interaction with HeLa cervical epithelioid cells and EM42 endometrial cells.** PhD thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mycoplasma (M.) genitalium is an important cause of sexual transmitted disease and has been implicated in a range of genital tract disorders. Still, very few studies have examined biological properties and growth characteristics of *M. genitalium*. A hallmark feature of *M. genitalium* and other pathogenic mycoplasmas is the establishment of chronic infections that can persist despite completion of appropriate antibiotic therapies. The adherence of mycoplasmas is a key virulence attribute, pathogenic features and consequences of host-cell colonization. Herein, we characterize growth properties of two *M. genitalium* strains (G37 and 1019V) using BCA assay, OD₆₀₀, CCU assay, real-time PCR. Based upon these strategies, we compared the behavior of similarly grown *M. genitalium* variants coincubated with HeLa cervical epithelioid cells and EM42 endometrial cells over a dynamic time course. using laser scanning confocal microscopy. *M. genitalium* G37 is a multiply passaged type strain isolated from a male while 1019V was recently isolated from human cervical samples and only minimally passaged. Both strains further diverge by sequence heterogeneities within adherence-related MG191 and MG192 genes. Despite these differences, our results identified only subtle variations in axenic growth for the two strains. Further and consistent with previous studies, a subset of adherent *M. genitalium* organisms invaded host cells. However, intranuclear localization was observed, which occurred as early as 30 minutes after infection.

Key words: *Mycoplasma genitalium*; Growth curve; Adherence; Cytoplasmic Invasion; Nuclear invasion.

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) são hoje consideradas um grave problema de saúde pública por sua magnitude, pela dificuldade em identificar os seus sintomas e, principalmente, por serem grandes facilitadoras da transmissão do HIV. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram, no mundo, cerca de 340 milhões de casos de DST por ano. Nessa estimativa, não estão incluídos a herpes genital e o papiloma vírus humano – HPV (BRASIL, 2003).

Em 1997, foi fundado o programa de controle das DST/AIDS, porém a falta de profissionais capacitados, de procedimentos padrões de diagnósticos e a não obrigatoriedade em reportar os casos de DST, subestima os reais dados destas doenças (BACON et al., 2004).

Tabela 1 - Prevalência e incidência estimada de DSTs no Brasil em 2001

Patógeno	Prevalência (%)	Incidência (%)
Papiloma Vírus Humano	15.2	0.8
Herpes Virus Simplex II	12.6	0.8
<i>Treponema pallidum</i> (Sífilis)	2.06	1.1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	3.4	5.1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.71	1.8
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1.92	2.3

FONTE: Adaptada de Bacon et al., 2004.

A uretrite causada por Clamídia (*Chlamydia trachomatis*) é a doença sexualmente transmissível de maior prevalência mundial. Sua manifestação é semelhante à da gonorréia. Em algumas situações, os pacientes são assintomáticos tornando o homem ou a mulher portador destas bactérias. (BRASIL, 2003).

As uretrites humanas causadas por microrganismos do gênero *Mycoplasma* e *Ureaplasma* têm sido associadas com esta afecção (RAZIN e HERRMANN, 2002).

Mycoplasma (M.) genitalium é o agente causador de uretrite não gonocócica (UNG) aguda em 14 a 33% dos casos em indivíduos do sexo masculino (DEGUSHI e MAEDA, 2002). Infecções causadas por *M. genitalium* aparecem de forma independente, ou seja, não associadas às infecções causadas por *C. trachomatis*, outra grande causadora de UNG (KEANE et al., 2000). Utilizando-se a metodologia da PCR verificou-se que 73% das infecções uretrais causadas por *M. genitalium* em homens eram sintomáticos, ao contrário das infecções por *C. trachomatis*, das qual metade não apresentava sintomatologia (FALK et al., 2004). As UNG por *M. genitalium* em homens são mais freqüentes na faixa etária entre 18 a 45 anos, enquanto que as infecções por *C. trachomatis* são mais freqüentes em indivíduos mais jovens (JENSEN et al., 2004a). As recorrências das UNG por *C. trachomatis* são raras, ao contrário das infecções por *M. genitalium* que, mesmo após tratamentos adequados, tornam-se crônicas em 20 a 60% dos casos (FALK et al., 2003; HORNER et al., 2001).

M. genitalium é sexualmente transmissível, verificando-se que aproximadamente 70% das mulheres parceiras de homens infectados apresentaram este agente (FALK et al., 2004). O aumento do número de pacientes mulheres infectadas por *M. genitalium* reforça o papel deste agente como causador de infecções urogenitais em mulheres. Há relatos demonstrando estas infecções associadas à cervicite mucopurulenta (FALK et al., 2005; MANHART et al., 2003), endometrites (COHEN et al., 2002; SIMMS et al., 2003), doenças pélvicas inflamatórias (SIMMS et al., 2003) e possivelmente infecções das trompas, resultando em seqüelas como gravidez atópica ou infertilidade (CLAUSEN et al., 2001). Além disso, há casos esporádicos de *M. genitalium* presentes em infecções extragenitais (BASEMAN e TULLY, 1997). Alguns trabalhos reportam que este agente foi isolado, juntamente com o *M. pneumoniae*, em infecções do trato respiratório (BASEMAN et al., 1988), como único agente no líquido sinovial de pacientes com artrite (TULLY et al., 1995; TAYLOR-ROBINSON, 1994) e na medula de crianças com encefalite (SAKATA et al., 1993). Estudos sugerem que o *M. genitalium* possui um papel importante como fator de risco na progressão da AIDS (PEREZ et al., 1998). Savio et al. (1996) e Martinelli et al. (1999) observaram o aumento da frequência do *M. genitalium* (37.5 e 56.0%,

respectivamente) na uretra de pacientes aidéticos com ausência de sintomas de uretrite.

A habilidade do *M. genitalium* em persistir em infecções e sua recorrência, após tratamentos com antibioticoterapia, sugerem resistência à resposta imune. Uma das possíveis justificativas é a sua capacidade em invadir e residir dentro de células epiteliais hospedeiras (BASEMAN et al., 1995; JENSEN et al., 1994). Bactérias intracelulares persistem viáveis dentro de células hospedeiras na presença de antibióticos que agem extracelularmente. Estes achados parcialmente justificam as dificuldades no isolamento de *M. genitalium* de materiais clínicos, mesmo após a sua visualização pela microscopia e confirmação pelas análises moleculares (DALLO e BASEMAN, 2000). Recentes estudos têm demonstrado, *in vivo*, evidências do potencial invasivo do *M. genitalium* (BLAYLOCK et al., 2004).

O aumento da significância deste patógeno, assim como sua importância na saúde humana nos alerta para futuros estudos e melhores ferramentas diagnósticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação e evolução

O primeiro micoplasma a ser isolado em cultura foi o agente da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (CBPP), conhecido atualmente como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, que foi descrito pela primeira vez por Nocard e Roux em 1898 (RAZIN, 1995). Nos anos seguintes, estudou-se a importância desta bactéria conhecida como, *Pleuropneumonia-Like Organisms* (PPLO) como causa de várias doenças em animais (MOROWITZ, 2002; RAZIN, 1992b)

O termo “micoplasma” (Greco: *Mykes* = fungo e *Plasma* = forma da célula) surgiu em 1950 e substituiu a antiga terminologia PPLO. Nos anos 60, os micoplasmas foram designados membros da classe *Mollicutes*, que deriva da palavra em Latin: macio (*mollis*) e pele (*cutis*). Recentemente, algumas antigas riquetsias e outras bactérias de taxonomia indefinida, devido a similaridade genômica, foram incluídas aos *Mollicutes*. Estes microrganismos compõem atualmente cinco ordens, seis famílias, 12 gêneros e aproximadamente 200 espécies, que se distribuem entre humanos, animais, insetos e plantas. Atualmente, estes microrganismos são genericamente designados por mollicute, sendo o termo micoplasma utilizado apenas para as espécies do gênero *Mycoplasma* (RAZIN, 1992b; 1998).

Os membros da classe *Mollicutes* são caracterizados pelo pequeno tamanho dimensional e seu genoma reduzido. Possuem um único cromossomo em formato circular contendo 0,58 a 2,2 Mbp, baixa quantidade de Guanina e Citosina (23 a 40 mol%), ausência de parede celular, organelas essenciais apenas para seu crescimento e replicação, membrana plasmática, ribossomos e uma molécula de DNA (RAZIN, 1978).

A taxonomia desta classe é baseada na sequência do rRNA 16S, o qual sugere que os mollicutes são muito próximos do subgrupo das eubactérias gram-positivas, que inclui os bacilos, estreptococos e lactobacilos (HERRMANN et al., 1999). O menor genoma conhecido de um organismo autoreplicativo possui 0,58 Mb e pertence ao *M. genitalium* (FRASER et al., 1996). Desta maneira, esta bactéria possui limitada atividade biossintética que

justifica suas características biológicas, relação parasita-hospedeiro e exigências nutricionais (RAZIN et al., 1998; ROTTEM e YOGEV, 2000). Os micoplasmas, em geral, colonizam as células superficiais de mucosas sobrevivendo ou multiplicando-se por longos períodos de tempo como agentes oportunistas ou patogênicos (DALLO e BASEMAN, 2000).

2.2 Propriedades gerais

O maior impedimento na pesquisa e no diagnóstico laboratorial das infecções causadas por mollicutes tem sido a dificuldade em cultivá-los *in vitro*. Alguns dos mollicutes cultiváveis crescem lentamente, mesmo utilizando-se meio de cultivo adequado (RAZIN, 1994).

A falta de parede celular rígida de todos os membros da classe *Mollicutes* previne-os de serem corados através do Gram, conferindo o pleomorfismo de suas células e tornando-os susceptíveis a desidratação. Outra característica da maioria dos mollicutes é a necessidade da adição de soro no meio de cultura (WAITES et al., 2005a), que fornece, entre outros nutrientes, ácidos graxos e colesterol (requerido para a síntese da membrana) (RAZIN et al., 1998).

Devido à perda de vias enzimáticas características de outras bactérias e presença de vias ineficientes de produção de energia, algumas espécies utilizam a via glicolítica e produzem ácidos a partir de carboidratos. Outros *Mollicutes* utilizam a via de hidrólise da arginina, que resulta na produção de ornitina, ATP, CO₂ e amônia, ou ainda, o catabolismo da uréia (RAZIN, 1995).

Os mollicutes apresentam a forma de “ovo frito” quando cultivado em meio sólido. Em meio líquido, o crescimento geralmente não causa turvação, provocando somente alteração do pH, revelado por um indicador presente no meio de cultura (RAZIN, 1995).

As proteínas correspondem a dois terços da massa total da membrana dos micoplasmas, sendo que o restante da membrana é composta por lipídio. As membranas lipoprotéicas dos micoplasmas têm atraído muita atenção nos últimos anos devido a sua grande quantidade quando comparada com o limitado número de lipoproteínas de membranas presentes em outras eubactérias. Além disso, as lipoproteínas de membranas são os maiores

responsáveis pelas características antigênicas dos molicutes (CHENG et al., 1996; FERRIS et al., 1995).

As variações antigênicas têm se tornado um dos assuntos de maior interesse nas pesquisas das doenças infecciosas causadas pelos micoplasmas, sendo que as variações fenotípicas são consideradas o maior fator de patogenicidade e causa de infecções crônicas nos hospedeiros (LIU et al., 2001; RAZIN et al., 1998; ROSENGARTEN et al., 1994; ROSENGARTEN e YOGEV, 1996; YOGEV et al., 1991). Durante sua evolução e adaptação como parasitas, os molicutes desenvolveram sistemas genéticos de grande plasticidade, tornando-os capazes de variar suas proteínas de superfície. Esta característica é manifestada pela grande quantidade de mutações e conseqüente variação antigênica, que os protegem da ação do sistema imune permitindo-os escapar do ataque dos anticorpos (RAZIN et al., 1998).

2.3 Estudos da curva de crescimento

Descrições de curvas de crescimento em *Mollicutes* são pouco freqüentes devido ao seu pequeno tamanho, seu genoma mede entre 0,58 - 2,2,Mbp (ROBERTSON et al.,1983; ASSUNÇÃO et al., 2006), e baixas concentrações por mL, principalmente devido ao seu crescimento lento (ROBERTSON, 1978). Além disso, muitas espécies de molicutes formam microcolônias em caldo, aderem ao plástico ou vidro dos frascos e exigem meios complexos de crescimento (ASSUNÇÃO et al., 2006).

De acordo com Miles (1992) a construção da curva de crescimento de molicutes é dificultada principalmente pelas suas exigências nutricionais, lentidão no desenvolvimento celular, polimorfismo e fragilidade osmótica

Rodwell e Whitcomb (1983) classificam as técnicas de cultivo dos molicutes em (1) métodos diretos, como a análise de proteína total, peso seco dos sedimentos microbianos, enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC) ou unidades de mudança de cor (CCU); (2) métodos indiretos, como a avaliação da turbidez pela densidade óptica, produtos metabólicos, atividade respiratória em cultivo ou incorporação de precursores marcados com isótopos (^3H thymidine e ^{14}C -labeled amino acids).

A análise da densidade óptica para enumeração de micoplasmas foi realizada por Cleverdon e Morowitz em 1960. *M. gallisepticum* foi cultivado em caldo por seis dias à 37°C. Os valores obtidos por meio do método de densidade óptica foram convertidos em número mais provável utilizando as tabelas de conversão de Havorlerson e Ziegler, Fisher-Yates e equação de Poisson.

Baseman et al. (1995) monitoraram o crescimento da população de micoplasmas em caldo avaliando-se o aumento da proteína total microbiana pelo método de BCA (ácido biocincônico).

A metodologia da PCR em tempo-real é utilizada como ferramenta diagnóstica dos micoplasmas de interesse humano (DEGUSHI et al., 2002; MOROZUMI et al., 2006), no entanto, esta técnica também têm sido aplicada na determinação da curva de crescimento de outros microrganismos de crescimento lento e/ou intracelulares (HUNFELD, et al., 2004; ROCH e MAURIN, 2005; ROLAIN et al., 2004).

2.3.1 A importância do estudo da curva de crescimento

A determinação da curva de crescimento dos mollicutes permite estudar: os fatores que afetam o seu desenvolvimento, interferência dos agentes antibacterianos (WATSON et al., 1969) e os fatores nutricionais *in vitro* (ANDERSON et al., 1965); a diversidade entre os isolados (KELTON, 1960 e 1962; LOW e EATON, 1965); o metabolismo, estrutura ou morfologia destes microrganismos e os fatores que contribuem na patogenicidade (MILES, 1992). Anderson et al. (1965), obtiveram dados importantes do ciclo de vida e reprodução de *M. laidlawi* (*A. laidlawi*) analisando a fase logarítmica de crescimento das culturas.

2.4 Interações com as células hospedeiras

Os micoplasmas possuem hospedeiros estritos e especificidade por tecidos, provavelmente devido as suas exigências nutricionais e tipo de vida parasitária. No entanto, há vários relatos demonstrando a presença dos

micoplasmas em hospedeiros e tecidos não habituais (RAZIN, 1992b). *M. pneumoniae* é encontrado parasitando, preferencialmente, o trato respiratório e o *M. genitalium*, o trato urogenital. No entanto, *M. genitalium* foi isolado do trato respiratório e o *M. pneumoniae* foi isolado do trato genital (GOULET et al., 1995). O *M. hominis* é considerado habitante normal da uretra e da mucosa vaginal humana, sendo isolado em indivíduos comprovadamente saudáveis, no entanto este agente pode causar infecções no próprio trato genital e ser isolado em outras regiões, como no líquido sinovial, sangue e líquido (MEYER e CLOUGH, 1993). Mais raramente, micoplasmas considerados de origem animal foram encontrados em infecções humanas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (WAITES e TALKINGTON, 2005b).

2.4.1 Aderência ao tecido hospedeiro

A aderência aos tecidos hospedeiros é um dos fatores de virulência mais importantes entre os micoplasmas. Espécies comprovadamente dependentes da aderência para a sua patogenicidade tornam-se avirulentas quando mutantes (BASEMAN e TULLY, 1997; RAZIN e JACOBS, 1992a). Os sistemas de aderência mais estudados são os de *M. pneumoniae* e de *M. genitalium*. Estes microrganismos podem apresentar-se em forma de pêra e com presença de filamentos. A citoaderência é o processo inicial de colonização, invasão e posteriores danos patogênicos ao hospedeiro (BARILE e ROTEM, 1993).

O *M. pneumoniae* possui uma projeção polar denominada de *bleb*, que possui função de aderência e motilidade. Nesta estrutura estão presentes as proteínas, P1 (169-kDa) e P30 (30-kDa) que são responsáveis pela aderência à célula hospedeira (DALLO et al., 1990; INAMINE et al., 1988). Este micoplasma ainda possui outros dois grupos de proteínas acessórias, sendo que o primeiro inclui uma proteína de 40-kDa e outra de 90-kDa (denominadas de P40 e P90, respectivamente), e o segundo inclui as proteínas HMW1-HMW3. Estas proteínas não são consideradas adesinas, mas a perda de uma delas está associada à inabilidade do *M. pneumoniae* em aderir à célula hospedeira (DIRKSEN et al., 1996; KRAUSE et al., 1982; KRAUSE, 1996)..

O *M. genitalium* possui a proteína de 140-kDa na superfície da membrana, denominada P140, MgPa ou MG191 (MENARGH et al., 1993), que é homóloga a proteína P1 ou MPN141 de *M. pneumoniae* e possui a proteína originalmente designada MgPc, P110 ou MG192, com função de adesão, que também está relacionada ao produto Orf6 ou MPN142 de *M. pneumoniae* (DHANDAYUTHAPANI et al., 1999).

A adesina de 30-kDa (P30) de *M. pneumoniae* é homóloga à proteína de 32-kDa (P32) do *M. genitalium*. Estas proteínas estão localizadas quase que exclusivamente na porção *bleb* ou na base desta (SETO et al., 2001) e as proteínas acessórias de citoaderência estão envolvidas na estabilização da porção apical do *bleb* (PROFT et al., 1996).

2.4.2 Invasão nas células hospedeiras

Apesar dos micoplasmas serem cultivados em meios artificiais, preferem e sobrevivem na superfície das células epiteliais, sendo algumas espécies capazes de invadir células não fagocíticas. Esta intracelularidade protege os micoplasmas da resposta do sistema imune, da ação dos antibióticos e contribui no estabelecimento de infecções latentes e crônicas (BASEMAN et al., 1996; RAZIN et al., 1998 ; ROTTEM, 2003).

O *M. penetrans*, isolado no trato urogenital de pacientes aidéticos (LO, 1991; 1993b), invade e sobrevive no interior das células hospedeiras, localizando - se nas regiões citoplasmáticas e perinucleares (ANDREEVE et al., 1995; BOROVSKY et al., 1998; GIRÓN et al., 1996). Estudos ultra-estruturais utilizando células HEp-2 (carcinoma de células humanas de laringe) infectadas com *M. penetrans* demonstraram que estes microrganismos formam uma invaginação da membrana celular ou são internalizadas no citoplasma das células hospedeiras em até duas horas após a infecção (GIRÓN et al., 1996).

Outros micoplasmas também demonstraram potencial invasivo em condições experimentais, como o *M. fermentans* em células epiteliais do trato respiratório de ratos LEW (STADTLANDER et al., 1993) e células de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) (TAYLOR-ROBINSON et al., 1991). *M. pneumoniae* foi encontrado no espaço intracitoplasmático e região perinuclear

de células de pulmão humanos - WI-38 ((BALISH e KRAUSE, 2002; BASEMAN et al., 1995) e células de carcinoma de pulmão - A549 (YAVLOVICH et al., 2004a). *M. genitalium* foi visualizado dentro de vacúolos próximos ao núcleo e no interior do citoplasma de células de fígado de macaco - VERO (JENSEN et al., 1994). *M. galisepiticum* foi visualizado no interior de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) e células HeLa, cinco minutos pós-infecção, parasitando todo o espaço citoplasmático e região perinuclear da célula hospedeira. Estes micoplasmas persistiram no interior da célula por até 24 horas (WINNER et al., 2000).

Muitos estudos estão sendo realizados para identificar se estes micoplasmas estão aderidos à membrana celular ou se estão localizados intracelularmente. Modernas e sofisticadas técnicas estão sendo utilizadas, como a combinação de imunohistoquímica e microscopia eletrônica, que permitem a visualização de micoplasmas extra e intracelulares (TAYLOR-ROBINSON et al., 1991) e o ensaio de resistência a gentamicina, que é o mais comum, pois não atinge as bactérias intracelulares que podem, assim, serem detectadas (ELSINGHORST, 1994; SHAW e FALKOW, 1988). A técnica de imunofluorescência combinada com a microscopia confocal também permite diferenciar a localização dos micoplasmas em células infectadas (BASEMAN e TULLY, 1997; BOROVSKEY et al., 1998).

2.4.3 Importância do estudo da invasão

A invasão e difícil detecção do micoplasma no interior da célula (citoplasma e/ou núcleo) podem interferir nas pesquisas biomédicas quando são infectados animais de laboratório ou cultura de células (BASEMAN e TULLY, 1997; NICOLSON et al., 2003). Estas bactérias utilizam os nutrientes necessários para as células e interferem na reposta das células desafiadas em experimentos (COPPERMAN e MORTON, 1966; MIYAZAKI et al., 1990), reduzindo o crescimento, causando alterações na morfologia, na composição da membrana e no metabolismo de aminoácidos, resultando em aberrações cromossomais e indução ou supressão da expressão da citocinas (McGARRIT et al., 1992). Tsai et al. (1995) demonstraram que as infecções prolongadas por

micoplasma em culturas podem induzir transformações malignas nas células. As nucleases produzidas pelos micoplasmas nas culturas celulares acidentalmente contaminadas causaram alterações no metabolismo dos ácidos nucleicos de células eucariontes (McGARRITY et al., 1984; PATON et al., 1965). Verificou-se também que as proteínas dos micoplasmas podem induzir apoptose nas células hospedeiras (HALL et al., 2000; RAWADI et al., 1996) e que a degradação internucleossomal do DNA das culturas celulares contaminadas ocorre devido a atividade da endonuclease dos micoplasmas (PADDERBERG et al., 1998). Em experimentos de cultura de órgão de hamsters foi demonstrado que o *M. pneumoniae* causou diminuição de aminoácidos, galactose, proteínas e síntese de ácido ribonucleico (RNA) nas células hospedeiras (HU et al., 1975).

Estudos demonstraram que aproximadamente 30% das culturas celulares apresentam-se contaminadas por micoplasma (SMITH e MOWLES, 1996), sendo que *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini* e *M. salivarium* são responsáveis por 95% das contaminações (McGARRITY et al., 1992). Em um estudo realizado na cidade de São Paulo, Brasil, foram coletadas 301 amostras de culturas celulares originadas de 15 laboratórios; destas, 12 foram positivas para a presença de micoplasma. (TIMENETSKY et al., 2006). Diesbach et al. (2003) testaram as culturas de células presentes em seu laboratório e interessante, encontraram contaminações por micoplasmas somente nos lotes de células - HepG2, sendo que estas foram obtidas de diferentes fontes de origem. Neste experimento todas as culturas de células foram incubadas e testadas sob as mesmas condições.

As contaminações das culturas celulares pelos micoplasmas podem ser identificadas por meio de diversas técnicas, como: pela microbiologia convencional, hibridização de RNA, PCR e ELISA; porém nenhuma destas é ideal pelo custo elevado, demora dos resultados, falta de confiabilidade, especificidade e sensibilidade (GARNER et al., 2000; UPHOFF e DREXLER, 2002; UPHOFF et al., 1992). Além disso, muitas culturas celulares contaminadas são tratadas com antibióticos, mascarando a presença do agente por vários anos e consequentemente contribuindo para sua persistência (COBO et al., 2005; SHAMES et al., 1970; SMITH e MOWLES, 1996).

2.5 Mollicutes em humanos

Em 1937, foi isolado das glândulas de Bartolin, a primeira espécie humana de micoplasma, o *M. hominis* (BOVE, 1999; DIENES e EDSALL, 1937). Nos anos 40, Eaton et al., identificaram o agente da pneumonia atípica primária, que foi primeiramente classificado como vírus até 1961 (MARMION E GOODBURN, 1961), sendo em 1964 denominado de *M. pneumoniae* (CHANOCK et al., 1963). Em 1952, *M. fermentans* foi isolado do trato urogenital humano, sendo posteriormente isolado de lesões de sarcoma de Kaposi em paciente HIV - positivo (RUITER e WENTHOLF, 1952; LO et al., 1991). Em 1981, *M. genitalium* foi isolado da uretra de homens com sintomas clínicos de uretrite não gonocócica (UNG) (TULLY et al., 1981), e na década de 90, *M. penetrans* foi isolado de amostras de urina de pacientes aids (LO et al., 1991).

Recentemente, foi indentificada a espécie *M. amphoriforme*, que tem sido encontrada em secreções do trato respiratório inferior de muitos indivíduos imunocompetentes e está associada a bronquite crônica. Muitas pesquisas têm sido realizadas para determinar se esta espécie é patogênica para os humanos (WAITES e TALKINGTON, 2005b).

As descobertas de mollicutes na microbiota normal humana têm sido progressivas, porém lentas. Apesar de estas bactérias serem fastidiosas para o isolamento em amostras clínicas, os métodos moleculares de detecção, como a PCR, contribuem para o seu diagnóstico (RAZIN, 1994)

Cerca de 20 espécies de mollicutes têm sido descritas em humanos (a Tabela 1 representa 16 destas 20 espécies). Estas colonizam principalmente a superfície das mucosas do trato respiratório e urogenital. Muitas residem extracelularmente, mas algumas como o *M. pneumoniae*, *M. genitalium* e *M. penetrans* podem colonizar e sobreviver intracelularmente em células de laringe humana (HEp-2) (DALLO e BASEMAN, 2000).

M. fermentans e *M. penetrans*, por terem sido isolados de pacientes aids, são considerados, entre outros micoplasmas de origem humana, como potenciais agentes moduladores da resposta imune e indutores da replicação da AIDS (CHOWDHURY et al., 1990), portanto, possíveis cofatores

no desenvolvimento da AIDS (MONTAGNIER e BLANCHARD, 1993; GRAU et al., 1998).

Alguns mollicutes pertencem a microbiota da orofaringe, como *M. salivarium* e *M. orale*, as espécies mais comumente encontradas. *M. pneumoniae* é a micoplasmose de maior importância médica, colonizando o trato respiratório inferior e causando doenças respiratórias e pneumonia (RAZIN e HERRMANN, 2002).

M. hominis e *U. urealitycum* são freqüentemente isolados do trato urogenital inferior de homens e mulheres saudáveis, causando doenças nesta região. A colonização destas espécies varia com a idade, raça, *status* hormonal e número de parceiros sexuais. *U. urealitycum* está relacionado com a infertilidade em mulheres, diminuição da motilidade e alteração morfológica dos espermatozóides (TAYLOR – ROBINSON et al., 1999). Ambas as espécies podem invadir o líquido cérebro - espinhal de neonatos causando meningo-encefalite, danos neurológicos ou morte. (ALONSO-VEGA et al., 1997; WAITES et al., 1988).

M. orale e *M. fermentans* estão entre as espécies mais freqüentemente detectadas como contaminantes de culturas celulares (DREXLER e UPHOFF, 2000).

Tabela 2 - Micoplasmas isolados de humanos

Espécie	Sítio primário de colonização		Tipo de metabolismo		Patogênico ^a
	Trato respiratório	Trato urinário	Glucose	Arginina	
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	-	+
<i>M. salivarium</i>	+	-	-	+	-
<i>M. orale</i>	+	-	-	+	-
<i>M. buccale</i>	+	-	-	+	-
<i>M. faucium</i>	+	-	-	+	-
<i>M. lipophilum</i>	+	-	-	+	-
<i>M. hominis</i>	-	+	-	+	+
<i>M. genitalium</i>	-	+	+	-	+
<i>M. fermentans</i>	+	+	+	+	?+
<i>M. penetrans</i>	-	+	+	+	?
<i>M. primatum</i>	-	+	-	+	-
<i>M. spermatophilum</i>	-	+	-	+	-
<i>M. pirum</i>	?	?	+	+	-
<i>Ureaplasma spp</i> ^c	-	+	-	-	?
<i>A. laidlawii</i>	+	-	+	-	-
<i>A. oculi</i>	?	?	+	-	-

FONTE: Adaptada de Blanchard e Bébear (2002)

^a Em paciente imunocompetentes

^c Metabolizam uréia

+, papel comprovado; ?+, alguma evidência a favor; ?, questionável; -, não patogênico

2.6 *M. genitalium*

M. genitalium foi inicialmente isolado da uretra de dois homens apresentando UNG (TULLY et al., 1981). A uretrite está associada à irritação na região do pênis, elevado número de leucócitos polimorfonucleares e presença de exsudato.

Atualmente, a UNG está entre as doenças infecciosas mais comumente encontradas em homens atendidos nas clínicas de doenças sexualmente transmissíveis. Estima-se a ocorrência de cerca de 2 milhões de casos ao ano nos Estados Unidos (ARAL e HOLMES, 1999). Infelizmente, no Brasil, estes dados são praticamente desconhecidos para a grande maioria dos clínicos, pois o diagnóstico deste agente é realizado por meio de técnicas moleculares, que não estão implantadas na rotina da grande maioria dos laboratórios brasileiros (BRASIL, 2003).

Além da uretrite no homem, existe ainda a possibilidade de *M. genitalium* causar salpingite, sendo detectado por PCR no trato genital de 7% a 20% das mulheres atendidas em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis no Reino Unido (TAYLOR-ROBINSON et al., 1993). Seu envolvimento no trato urogenital das mulheres foi sugerido, pois este micoplasma foi capaz de aderir às células epiteliais das trompas de Falópio, observando-se um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos anti-*M. genitalium* em um terço de mulheres com doença pélvica inflamatória (MOLLER et al., 1984). Estes dados sugerem que, para ser estabelecida tais associações, são necessários estudos mais amplos. Além disso, o simples fato da existência deste tipo de infecção pode ser fator predisponente para a infecção pelo HIV (PEREZ et al., 1998).

2.6.1 Características gerais

As culturas de *M. genitalium* apresentam-se em forma de pequenos cocos, quando visualizados através da microscopia de campo escuro, não sendo observados detalhes de sua estrutura. Porém, em microscopia eletrônica podem ser visualizadas, em ambas as terminações, pequenas estruturas especializadas (KIRCHOFF et al., 1984). Estas estruturas permitem a motilidade do *M. genitalium* em círculos ou em direção horária. A média de sua velocidade é de aproximadamente 0,1 $\mu\text{m/s}$ (TAYLOR-ROBINSON e BREDT, 1983).

M. genitalium possui forma de pêra. A sua porção terminal está envolvida na adesão (TULLY et al., 1981, 1983) às superfícies de vidro e plástico (TULLY et al., 1981) e às células epiteliais em seu ambiente natural e/ou nos hospedeiros humanos (MENAUGH et al., 1993 e BASEMAN et al., 1995). Este agente possui todas as proteínas de aderência e acessórias semelhantes ao *M. pneumoniae* (HERRMAN e REINER, 1998).

Este microrganismo metaboliza glucose, mas não arginina ou uréia (TAYLOR-ROBINSON et al., 1981; TULLY et al., 1981, 1983), o que causa a acidificação do meio e redução do pH, cresce em temperatura ótima de 37°C, e as colônias se desenvolvem melhor em atmosfera de 5% de CO₂ (TAYLOR-ROBINSON et al., 1981; TULLY et al., 1981, 1983).

2.6.2 Características genômicas

O genoma do *M. genitalium* é circular e é considerado o menor genoma entre os organismos de vida livre. Estudos sugerem que esta redução é originária de um ancestral comum das bactérias Gram-positivas (ROGERS et al., 1985; WEINSBURG et al., 1989).

Assim como ocorreu com o *Haemophilus influenzae*, que foi o primeiro genoma seqüenciado, o reduzido tamanho do DNA do *M. genitalium* também motivou o seu posterior seqüenciamento (WIKIPEDIA, 2004).

O genoma do *M. genitalium* é constituído por aproximadamente 580 pares de bases (Figura 1), sendo dividido em 74 fragmentos pela enzima *EcoRI*. O estudo inicial do seu genoma com seqüências randômicas foi obtido por Peterson et al. (1993), sendo novamente seqüenciado por Fraser et al. (1996) que encontraram somente 470 regiões previamente codificadas e identificadas como genes requeridos para replicação do DNA, transcriptase e translação, reparo do DNA, transporte celular, e metabolismo energético.

Figura 1: Genoma do *M. genitalium*

FONTE: WIKIPEDIA, 2007

2.6.3 Mecanismos de patogenicidade

Os exatos mecanismos utilizados pelo *M. genitalium* para causar inflamação e alterações patológicas associadas à uretrite ou infecções extragenitais ainda são desconhecidos. No entanto, tem sido realizados estudos sobre os fatores envolvidos na colonização e resistência contra as defesas naturais dos hospedeiros e do sistema imune (TAYLOR-ROBINSON, 2001; BACZYNSKA et al., 2007).

As infecções são iniciadas com a colonização da superfície mucosa seguidas pela penetração no hospedeiro humano (Figuras 2 e 3). O mecanismo de colonização do *M. genitalium* é caracterizado pela citoaderência mediada pela sua porção apical (REDDY et al., 1996). A adesina dominante, MG191, facilita a fixação na célula hospedeira e está localizada dentro da porção C-terminal. Estudos sugerem que anticorpos contra a porção C-terminal bloqueia a aderência nas células epiteliais (SVENSTRUP et al., 2002). Esta porção terminal compartilha limitada identidade com a região correspondente da adesina homóloga do *M. pneumoniae*, o que pode justificar e contribuir para o seu tropismo celular. A natureza dos receptores celulares reconhecidos pelo MG191 é desconhecida, porém estudos com *M. pneumoniae* sugerem seu envolvimento nos resíduos de ácido silílico (CHANDLER et al., 1982; BASEMAN et al., 1982). Portanto, é possível que os carboidratos celulares funcionem como receptores para *M. genitalium*. A proteína MG192 também possui papel na citoaderência, pois o anticorpo específico para esta porção exposta da superfície da proteína bloqueia parcialmente a citoaderência do *M. pneumoniae* (SVENSTRUP et al., 2002). É possível que as respostas imunes diretas contra estes epítomos possam bloquear a citoaderência do *M. genitalium* e permitir a eliminação deste patógeno. Recentemente, *M. genitalium* foi visualizado fixando-se à mucina da vagina/cérvix de mulheres infectadas, sendo que a interação com a superfície uroepitelial apresentou papel importante na colonização dos hospedeiros (ALVAREZ et al., 2003). As três proteínas implicadas na ligação da mucina são todas componentes da cadeia glicolítica. Estas proteínas foram identificadas como alfa e beta piruvato desidrogenase e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A contribuição da GAPDH para fixação na mucina revela que a subfração (10%)

do total da proteína celular GAPDH é superfície dependente, e anticorpos anti-GAPDH bloqueiam aproximadamente 70% da fixação do *M. genitalium* à mucina da vagina/cérvix (ALVAREZ et al., 2003). Estes dados sugerem que *M. genitalium* compensa seu pequeno tamanho expandindo as funções de alguns de seus genes na melhora da colonização.

Figura 2 - Micrografia eletrônica de amostra clínica de derivado de célula vaginal marcado e embebida em resina LR branca de epoxy. B) Painel mostrando o *M. genitalim* na região intracelular o qual foi marcado com anticorpo anti-*M. genitalium*; B') Painel B ampliado mostrando o micoplasma intacto na membrana antes de invadir a célula.

FONTE: Adaptado de Blaylock et al., J Clin Microbiol, 2004.

A presença da proteína metionina sulfóxido redutase A (MsrA) no *M. genitalium* é um fator de proteção contra os agentes oxidantes associados com a imunidade inata do hospedeiro (DHANDAYUTHAPANI et al., 2001). *M. genitalium* pode induzir mudanças citopatológicas em culturas celulares (BASEMAN et al., 1995 e 1996). Estes danos celulares podem ser causados pela substância peróxido hidrogenase gerada pelos micoplasmas, que contribuí com sua atividade hemolítica (KANNAN e BASEMAN, 2000). Outros fatores que contribuem para as infecções são as respostas ao estresse térmico que estão envolvidas na adaptação das mudanças ao meio ambiente encontrada nos hospedeiros e têm sido estudadas no *M. pneumoniae* (WEINER et al., 2003). Estes elementos regulatórios também foram encontrados no *M. genitalium* (HIMMELREICH et al., 1997).

Figura 3 - Visualização seqüencial de uma amostra clínica de célula vaginal infectada por *M. genitalium* através de imunoanálise confocal. Os núcleos das células foram corados com Propídio de iodo e o *M. genitalium* foi marcado com isotiocianato. As secções ópticas seriadas em Z de 1µm de diâmetro (A a F) permitem a visualização do *M. genitalium*, representados por pontos fluorescentes, na superfície e no interior da célula.

FONTE: Adaptado de Blaylock et al., J Clin Microbiol, 2004.

A habilidade do *M. genitalium* em penetrar nas células hospedeiras, persistir em indivíduos infectados e possibilitar a recorrência após o tratamento antibiótico sugere que este micoplasma pode evadir do sistema imune. Muitos estudos têm demonstrado que este microrganismo pode penetrar e persistir no interior das células epiteliais (BASEMAN et al., 1995; JENSEN et al., 1994).

2.6.4 Importância do estudo de invasão para o *M. genitalium*

Ambas as análises transcripcionais das frações do núcleo e imagens de células vivas infectadas contribuem aos futuros estudos sobre a viabilidade e possível replicação associada ao parasitismo do *M. genitalium*. Estes estudos poderão servir de ferramentas para estabelecer o melhor tratamento para as doenças causadas por este micoplasma, pois não há protocolos adequados de tratamento (TOSH et al., 2007). Além disso, a coexistência de diferentes doenças sexualmente transmissíveis comumente encontradas em um mesmo indivíduo (FORTERBERRY et al., 1999), são atribuídas a vários fatores; incluindo a rota comum de transmissão, comportamento sexual e composição da flora residente (MARTIN et al., 1999).

A associação das doenças sexualmente transmissíveis é importante na escolha do tratamento antibiótico adequado, pois as uretrites são muitas vezes tratadas para clamídias, mas podem estar associadas ao *M. genitalium*. (McORIST, 2000). Embora, o antibiótico tetraciclina seja a droga de eleição no tratamento das UNG, devido ao seu baixo custo e boa eficácia clínica no tratamento das infecções por clamídias, vários estudos indicam que o tratamento de uretrite causada pela *C. Trachomatis* não é eficiente para erradicar o *M. genitalium* (JENSEN, 2004b). Taylor-Robinson e Horner (2001) observaram que nos últimos 20 anos, somente no Hospital St. Mary's em Londres foram realizados 19 estudos com homens apresentando doenças genitourinárias, nos quais 17 destes estavam relacionados à UNG aguda causada por micoplasmas. Em 10 destes estudos, o micoplasma foi encontrado com maior frequência na uretra de homens apresentando doenças clamidiais negativas, concluindo-se que o *M. genitalium* está associado à UNG aguda

independente da presença da *C. Trachomatis*, havendo evidências de que o *M. genitalium* é o agente causador da doença.

O uso de antibióticos suprime o crescimento e diminuí o número de micoplasmas detectáveis, porém não elimina a doença (TAYLOR-ROBINSON e FURR, 2000). Horner et al. (1993, 2001) observaram que todos os homens tratados com antibiótico doxicilina apresentaram uretrite por *M. genitalium* após terapia. Johannisson et al. (2000) encontraram resultados semelhantes ao detectarem que 62% dos homens apresentavam *M. genitalium* após 10 dias de tratamento com antibiótico tetraciclina.

Em outro trabalho, os homens que apresentavam uretrite causada por *M. genitalium* foram divididos em dois grupos de tratamento: um grupo composto de 16 homens recebeu tetraciclina e outro formado por seis homens recebeu azitromicina. Após o tratamento, todos os pacientes que receberam azitromicina apresentaram PCR negativo para o *M. genitalium*, no entanto, 10 (63%) dos que receberam tetraciclina apresentaram PCR positivo para *M. genitalium* (FALK et al., 2001, 2003). Degushi et al. (2002) observaram que os pacientes apresentando UNG positivo para *M. genitalium* e que foram tratados com antibiótico levofloxacina, na dose de 100mg, três vezes ao dia durante 14 dias apresentaram níveis abaixo de 50 cópias/ ml do *M. genitalium* após terapia. Embora os resultados da PCR e dos ensaios baseados na filogenia tenham sido positivos para o micoplasma, houve melhora dos sintomas clínicos da doença. Os autores concluíram que este protocolo de tratamento foi insuficiente para erradicar o micoplasma dos pacientes, tornando a infecção persistente e recorrente. Renaudin et al. (1992) e Bébéar et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes ao tratarem pacientes utilizando este mesmo protocolo de tratamento.

Hooton et al. (1988) detectaram na uretra, através de provas de DNA, a presença de *M. genitalium* em sete (22%) dos 32 pacientes, sendo a maior frequência observada em pacientes heterossexuais com UNG persistente em relação àqueles com UNG aguda ou sem uretrite. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Taylor-Robinson et al. (1993). Maeda et al. (2001) detectaram que cinco entre seis homens foram positivos para *M. genitalium* antes da antibioticoterapia e continuaram positivos ao final dos 14 dias de

tratamento com levofloxacina, sendo que um paciente apresentou recorrência da doença após o segundo tratamento.

Recentes estudos realizados na Escandinávia demonstraram que houve falha no tratamento com antibiótico doxicilina em mais de 50% dos pacientes apresentando UNG por *M. genitalium*, sendo que esta é a droga de eleição no tratamento das UNG (BJÖRNELIUS et al., 2007). Além disso, tem-se demonstrado que a prevalência das doenças sexualmente transmissíveis causadas pelo *M. genitalium* tem aumentado entre mulheres adolescentes das regiões urbanas, chegando a 13,6% (52/383) no estado de Indiana nos Estados Unidos (TOSH et al., 2007). Outros trabalhos realizados nos Estados Unidos e na China demonstraram que o uso de preservativos não protege de forma significativa contra as infecções causadas pelo *M. genitalium* (MANHART et al., 2003; PINGMIN et al., 2005). Como consequência, alguns autores relatam a possibilidade do *M. genitalium*, quando aderido ao espermatozoide dos homens infectados, ser transportado ao útero e trompa de falópio. Neste local, o *M. genitalium* poderia colonizar e destruir o epitélio ciliar, causando infertilidade nestas mulheres (SVENSTRUP et al., 2003).

2.7 PCR em tempo real

O PCR em tempo real surgiu como uma ferramenta que proporciona a análise quantitativa dos ácidos nucleicos (BUSTIN, 2000, 2002) e é uma técnica refinada do original PCR que foi desenvolvido nos anos 80 (SAIKI et al., 1985). Assim como a PCR, esta técnica necessita da presença de dois *primers* oligonucleotídeos, dNTPs, de uma polimerase e dos íons magnésio. A reação é realizada em ciclos com diferentes temperaturas que promovem a separação, o anelamento e a extensão da fita formada (KUBISTA et al., 2006).

O PCR em tempo-real necessita de um componente fluorescente (denominado de *reporter*) que se liga ao produto formado a partir da amplificação da seqüência do DNA desejado resultando em fluorescência. Este *reporter* gera um sinal fluorescente que reflete a quantidade de produtos formados. Durante os ciclos iniciais, este sinal é fraco, mas conforme os produtos são formados o sinal aumenta exponencialmente até chegar a um

ponto de saturação, que pode ser devido aos *primers*, ao *reporter*, aos dNTPs (KUBISTA et al., 2001), ou ainda, ao limitado número de moléculas de polimerase (KUBISTA et al., 2006). O número de ciclos necessários para iniciar a reação se chama valor Ct, que está demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Curva de amplificação do PCR em tempo real. O acúmulo dos produtos de PCR é detectado diretamente pela monitoração do aumento da fluorescência do marcador *reporter*. Esta figura caracteriza as curvas de amplificação: sinais em pontos fluorescentes X número de ciclos. Neste exemplo a curva está representada por três amostras, cada uma em duplicata. Os valores do coeficiente limite (C_t) estão indicados pelas flechas e representam a fração de ciclos aonde o instrumento de PCR em tempo real detecta a fluorescência ocorrida quando há a reação de amplificação. Os sinais fluorescentes, que são os pontos coloridos, durante o ciclo inicial da PCR estão abaixo da linha limite (representado na figura como linha *threshold*) e define a curva básica (representada na figura como *baseline*) para os pontos de amplificação. O aumento da fluorescência acima da linha limite indica a quantidade de produto de amplificação que estão sendo gerados. O parâmetro C_t é definido como o número fracional de ciclos da amostra clínica os quais partem de uma curva fixa da amostra, que é a curva limite (ou *threshold*). O ponto de log inicial do número de cópias da amostra do produto amplificado é uma curva reta, chamada de curva padrão, que está representada na Figura 5. A quantidade das amostras desconhecidas são amplificadas e quantificadas através do ponto C_t , que utiliza a curva padrão para determinar aonde se inicia o número de cópias.

FONTE: Adaptado de Bustin *et al*; Clinical Science, 2005

Figura 5 - Curva padrão do PCR em tempo real. Esta curva exemplifica a escala logarítmica para cinco amostras padrões. O ponto de cruzamento entre a linha limite (representado na figura como *threshold line*) e a curva do aumento de ciclos é o ponto Ct. A curva padrão é representada pelos valores Ct X o número logaritmo inicial de cópias da amostra padrão.

FONTE: Adaptado de Kubista et al., Molecular Aspects of Medicine, 2006.

A eficiência da técnica de PCR em tempo real pode ser estimada a partir da curva padrão. Após a corrida da PCR em tempo real as amostras lidas serão comparadas a curva padrão. Quanto mais próximas da curva padrão, melhor será a eficiência da técnica (RUTLEDGE e COTE, 2003).

Amostras biológicas podem conter substâncias inibitórias que podem diminuir a eficiência da técnica de PCR (AKANE et al., 1994; AL-SOUD et al., 2000; IZRAELI et al., 1991). Se há amostra suficiente, esta pode ser purificada ou diluída para diminuir os fatores de inibição da amostra (STAHLBERG et al., 2003).

Figura 6 - Reação de PCR em tempo real. Neste exemplo está sendo demonstrado o princípio da técnica 5' nuclease (*TaqMan*). Na fase da transcriptase reversa a cópia de cDNA é formada a partir do RNA molde. Após a etapa de denaturação, os *primers* e *probes* se anelam aos seus alvos. O *probe* contém o *reporter* na terminação 5' e o *quencher* na terminação 3'. Durante a etapa de polimerização a enzima 5' nuclease Taq polimerase separa os *probes*. Esta separação física do *reporter* e do *quencher* resulta na fluorescência do *reporter*, portanto, se não houver esta separação não há fluorescência. O aumento deste sinal é diretamente proporcional ao número de moléculas liberadas durante cada ciclo. O acúmulo de produtos de PCR é detectado diretamente monitorando o aumento da fluorescência do *reporter* que é lido pela máquina de PCR em tempo real.

FONTE: Adaptado de Bustin et al.; Clinical Science, 2005

2.7.1 Uso do PCR em tempo real na identificação do *M. genitalium*

Vários estudos têm sido realizados como auxílio no diagnóstico de *M. genitalium*, uma vez que esta bactéria é de difícil cultivo e isolamento. Yoshida et al. (2002) utilizaram PCR em tempo real baseado na técnica do *Taq-Man* para quantificar o número de *M. genitalium* do primeiro jato de urina de homens com uretrite e assintomáticos. Os autores quantificaram as concentrações específicas do gene rRNA 16S deste agente em uma faixa de 10^7 - 10^{10} cópias/reação em ambos os pacientes. As vantagens desta técnica são: permitir a amplificação e quantificação do DNA eliminando a necessidade de manipulações adicionais dos produtos de PCR, o que reduz os riscos de contaminação e permite processar rapidamente um grande número de amostras. Além disso, esta técnica monitora a quantidade de micoplasmas presentes na uretra após a erradicação da *Neisseria gonorrhoeae*, pois o *M. genitalium* pode ser um dos causadores da uretrite gonocócica pós-tratamento (UNO et al., 1996).

Em outro estudo, a técnica quantitativa 5' nuclease (*Taq-Man* PCR) foi desenvolvida, mostrando-se sensível e específica. Foram analisados swabes de uretra e urina de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Esta técnica detectou menos de cinco genomas de bactérias por reação sem reação cruzada com outros micoplasmas (DEGUSHI et al., 2002).

Justrand et al. (2005) compararam o uso de duas técnicas moleculares para detectar a presença de *M. genitalium* na região endocervical de mulheres e na urina de homens. Os autores compararam as técnicas de *LightCycler*PCR (LC-PCR) e PCR convencional. Os *primers* utilizados nestas duas técnicas foram idênticos sendo utilizado o fragmento 427bp do gene rRNA 16S de *M. genitalium*. Utilizando o PCR convencional como referência, o LC-PCR mostrou 99,7% de especificidade e 72,2% de sensibilidade para detecção de *M. genitalium* a partir de amostras de urina de homens, mas não houve diferença significativa entre LC-PCR e PCR convencional quando foram analisados os swabes da região endocervical das mulheres (58 e 65%, respectivamente). Porém, quando analisadas somente as urinas de pacientes mulheres, houve diferença entre as duas técnicas (38 e 73%, para PCR convencional e LC-PCR, respectivamente). Os autores justificam esta baixa sensibilidade da técnica de

LC-PCR provavelmente devido a fatores inibitórios e as limitações na quantidade de moldes de DNA. A técnica de LC-PCR foi considerada de fácil realização, além de proporcionar a detecção e quantificação do DNA, eliminando manipulações adicionais dos produtos de PCR, além disso, a técnica de LC-PCR foi capaz de detectar até um genoma bacteriano por reação.

O uso da técnica de PCR em tempo real contribuiu nos testes de susceptibilidade de *M. genitalium* aos antibióticos, pois quantifica o número de *M. genitalium* susceptíveis aos antibióticos em diversas diluições e em curto período de tempo. Este método tem ainda como benefício a validação da concentração inibitória mínima, denominado de MIC (em inglês: Minimum Inhibitory Concentration) em valores numéricos ao invés da visualização da mudança de cor do meio ou formação de colônias após certo período de tempo (HAMASUNA et al., 2005). O método de susceptibilidade aos antibióticos através do uso de PCR em tempo real vem sendo descrito principalmente para bactérias intracelulares, como é o caso das *Rickettsia* (ROLAIN et al., 2002), *Coxiella burnetti* (BRENNAN e SAMUEL, 2003) e *Trepheryma whipplei* (BOULOS et al., 2004).

2.8 Microscópio confocal

2.8.1 Histórico

O pioneiro na descoberta do microscópio confocal foi Marvin Minsky em 1955 (MINSKY, 1988). Os microscópios confocais modernos são baseados nos princípios descobertos por Minsky, porém os avanços na óptica e eletrônica têm melhorado a qualidade, velocidade e armazenamento das imagens geradas. Embora haja variedade de modelos de microscópios confocais, não há grandes diferenças entre estes (WILSON e CARLI, 1988), sendo que a maioria dos microscópios confocais ou refletem a luz a partir da amostra ou estimulam a fluorescência a partir do corante fluorescente (fluorocromos) aplicado na amostra. A diferença entre estas duas técnicas é mínima.

Existem métodos que envolvem a transmissão de luz através da amostra, mas esta técnica não é comum (SHEPPARD e SHOTTON, 1997a).

2.8.2 Microscopia confocal

A microscopia confocal pode melhorar as imagens convencionais de fluorescência através do registro da fluorescência gerada a partir do plano focal na amostra, rejeitando toda luz acima ou abaixo do plano focal (OLYMPUS, 2007).

Na Figura 5, o laser fornece a excitação da luz azul. A luz é refletida ao espelho que a direciona em várias posições, tanto verticalmente quanto horizontalmente. Este mecanismo dos espelhos possibilita a passagem do laser através da amostra, resultando em uma série de vantagens entre estes (SHEPPARD e SHOTTON, 1997b):

- a amostra é iluminada em todos os locais e uniformemente;
- o campo de visão pode ser ampliado controlando-se a amplitude dos estágios de movimento.

Figura 7 - Desenho esquemático da direção da luz do laser do microscópio confocal. A luz do laser atravessa a atinge a amostra sendo refletida pelos espelhos rotacionais. O seccionamento óptico ocorre assim que a luz passa pelo furo circular (*pinhole*) indo em direção ao detector PMT.

FONTE: Adaptado de Semwogerere, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, 2005.

Na Figura 7, a amostra contendo o corante é excitada pela luz emitida pelo laser sendo então fluorescida. A luz fluorescente (verde) é refletida no sentido oposto ao laser (em azul) pelo mesmo sistema de espelhos, sendo então transmitida pelo orifício circular (*pinhole*) e posteriormente medido pelos tubos fotomultiplicadores (PMT) (SEMWOGERERE, 2005)

No microscópio confocal não há completa visão da amostra, pois a cada instante somente um ponto é observado. Porém, para a visualização total da imagem o detector PMT é acoplado a um computador, o qual une as imagens (SEMWOGERERE, 2005).

A imagem criada pelo microscópio confocal é um apenas uma pequena região da amostra, que é denominado de secção óptica. As áreas fora da luz focada são rejeitadas, resultado da visualização de um ponto específico aonde a imagem apresenta uma melhor resolução (SEMWOGERERE, 2005).

2.8.3 Visualização em três dimensões (3D)

A habilidade do microscópio confocal em criar uma área específica, denominada de secção óptica, torna possível a visualização em três dimensões (3D) da amostra. Os dados resultam na coleção de uma série de secções ópticas geradas em curtos e regulares intervalos de tempo através de linhas ópticas verticais e horizontais nos eixos X, Y e Z, possibilitando a visualização da imagem em 3D. Um software pode combinar imagens em duas dimensões (2D) para criar a imagem 3D (SEMWOGERERE, 2005).

2.8.4 Opções de laser

Uma ampla faixa de lasers visíveis, incluindo Argônio (458nm, 488nm, 515nm), Hélio-Neônio Verde (543nm), Criptônio Amarelo (568nm) e Hélio-Neônio Vermelho (633nm) devem estar disponíveis para atender à maioria das aplicações padrão de fluorescência (OLYMPUS, 2007). Isto é, para distinguir determinadas estruturas, como as proteínas dentro da célula, é importante marcá-las com diferentes fluorocromos para que a imagem final possa ser visualizada individualmente. Pode-se obter este resultado através de dois

métodos: um é a escolha de um laser que possua ondas com linhas múltiplas de lasers, e outro é a escolha de um mesmo laser com capacidade de emitir luz em comprimento de onda diferente do qual foi excitado. (STELZER, 1995). Em ambos os casos, a emissão resultante é separada por filtros apropriados, sendo direcionados a diferentes detectores. (SHEPPARD et al., 1997c).

Existe uma série de lasers disponíveis, como:

Laser de Argônio Azul (488nm)

Laser de Argônio (457nm, 488nm, 514nm) multilinha

Laser de Hélio-Neônio Verde (543nm)

Laser de Hélio-Neônio Vermelho (633nm)

Laser de Criptônio Amarelo (568nm)

Laser de Hélio-Cádmio 442nm

Laser de Diodo 440nm

Laser de Diodo 405nm

Laser de Argônio UV (351nm)

Laser IV 750nm

2.8.5 Uso do microscópio confocal na identificação do micoplasma

O uso da técnica de microscopia confocal se tornou importante principalmente para a identificação e diagnóstico de micoplasmas intracelulares por ser um método não destrutivo, de alta resolução que permite a confirmação da presença do micoplasma infectando as células hospedeiras através da visualização destas em secções ópticas após fixação e marcação imunofluorescente (BOROVSKY et al., 1998).

Esta técnica tem sido utilizada tanto na identificação intracelular dos micoplasmas que causam doenças em humanos, como o *M. pneumoniae*, o *M. penetrans* e *M. genitalium* (BASEMAN et al., 1995; BLAYLOCK et al., 2004; DALLO et al., 2000), e em animais, como *M. gallisepticum*, agente causador da doença respiratória crônica das aves, que foi visualizado invadindo o interior de

células cervicais humanas, HeLa-29 e células de fibroblastos de embrião de galinha – CEF. Neste estudo, a técnica de microscopia confocal ofereceu uma simples e exata diferenciação entre os micoplasmas intra e extracelulares (WINNER et al., 2000).

Recentemente, a técnica de microscopia confocal demonstrou que os biofilmes formados pelos *M. putrefaciens* e *M. bovis*, agentes causadores de problemas respiratórios em ovinos e caprinos e pneumonia, atrite e mastite em bovinos, respectivamente, podem justificar sua sobrevivência por longos períodos no meio ambiente e contribuem para sua persistência no hospedeiro (McAULIFFE et al., 2006).

A microscopia confocal quando associada à microscopia eletrônica fornece informações sobre a localização das proteínas do micoplasma responsáveis pela adesão na célula hospedeira durante a divisão celular, (SETO et al., 2001). As imagens visualizadas através da técnica de microscopia sugerem que a formação e migração das organelas de adesão do *M. pneumoniae* ocorrem de forma coordenada durante sua divisão celular (BOATMAN, 1979).

No entanto, o mecanismo utilizado pelo *M. genitalium* para invasão e internalização nas células hospedeiras e demais detalhes sobre sua localização subcelular são deficientes, necessitando de ferramentas mais eficazes, além das técnicas convencionais de diagnóstico (STEIN e BASEMAN, 2006). Blaylock et al., (2004) observaram, através de microscopia confocal e eletrônica, os eventos da internalização do *M. genitalium* em células hospedeiras epiteliais e cervicais humanas de pacientes infectados. Neste trabalho, foram determinados os padrões de infecção do *M. genitalium* em espécimes clínicos, visualizado-se a presença destes na superfície das células vaginais e intracelularmente a estas. A Figura 8 representa as imagens das células infectadas sendo possível comparar os níveis de infecção dentro de espécimes e entre indivíduos.

Figura 8 - Visualização de uma amostra clínica de célula vaginal através de microscopia confocal. Os micoplasmas podem ser visualizados com intensos e discretos pontos brancos fluorescentes sendo que os níveis de infecção podem ser visualizados em cada painel. (A): negativo; B) positivo; C) fortemente positivo.

FONTE: Adaptado de Blaylock et al., J Clin Microbiol, 2004.

8 CONCLUSÕES

A partir destes resultados pode-se concluir que:

- A técnica de PCR em tempo-real, de análise da proteína total pela BCA e de análise da densidade óptica pela espectofotometria, permitiram obter a curva de crescimento de *M. genitalium*.
- A curva de crescimento de *M. genitalium* apresenta as fases típicas: de adaptação (lag), de crescimento exponencial (log) e estacionário.
- A cepa G37 de *M. genitalium* mostrou-se mais adaptada ao crescimento em meio SP-4 do que estirpe 1019V, quando observada sua viabilidade pela técnica de mudança de cor e sua curva de crescimento.
- A velocidade específica de crescimento (μx) foi maior para a estirpe 1019V do que para a cepa G37, quando analisadas pela análise de proteína total e densidade óptica.
- A cepa G37 e a estirpe 1019V de *M. genitalium* apresentaram comportamento invasivo semelhante nas células HeLa e EM42
- A cepa G37 e a estirpe 1019V de *M. genitalium* invadiram de maneira semelhante o núcleo das células HeLa e EM42 após 30 minutos de contato.
- Anticorpos anti-P14O de *M. genitalium* são capazes de transpor, sem uso de permeabilizantes, a membrana celular e nuclear das células HeLa e EM42 quando infectadas por 30 minutos com MOI DE 1:7 deste micoplasma

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERER, F.; LUX, S.; MICHEL, A.; ROHDE, M.; OHLSEN, K.; HAUCK, C. R. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalization. **J. Cell Sci.**, v. 118, p. 2189-2200, 2005.

AKANE, A.; MATSUBARA, K.; NAKAMURA, H.; TAKAHASHI, S.; KIMURA, K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood strains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. **J. Forensic Sci.**, v. 39, p. 362-372, 1994.

ALMAGOR, M.; YATZIV, S.; KAHANE, I. Inhibition of host cell catalase by *Mycoplasma pneumoniae*: a possible mechanism for cell injury. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 1, p. 251-256, 1983.

ALMAGOR, M.; KAHANE, I.; YATZIV, S. Role of superoxide anion in host cell injury induced by *Mycoplasma pneumoniae* infection. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 842-847, 1984.

ALMAGOR, M.; KAHANE, I.; WIESEL, J. M.; YATZIV, S. Human ciliated epithelial cells from nasal polyps as an experimental model for *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, 1985.

ALMEIDA, R. A.; ROSENBUSCH, R. F. Capsule like surface material of *Mycoplasma dispar* induced by in vitro growth in culture with bovine cells is antigenically related to similar structures expressed in vivo. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 3110-3125, 1991.

ALONSO-VEGA, C.; WAUTERS, N.; VERMEYLEN, D.; MULLER, M.F.; SERRUYS, E. A fatal case of *Mycoplasma hominis* meningoencephalitis in a full-term newborn. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p. 286-287, 1997.

AI-SOUD, W. A.; JONSSON, L.J.; RADSTROM, P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 345-350, 2000.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALVAREZ, R. A.; BLAYLOCK, M. W.; BASEMAN, J. B. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1417-1425, 2003.

ANDERSON, D.L.; POLLOCK, M.E.; BROWER, L.F. Morphology of *Mycoplasma laidlawii* type A. **J. Bacteriol.**, v. 90, p. 1768-1777, 1965.

ANDERSSON, S. G.; KURKLAND, C. G. Reductive evolution of resident genomes. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 263-268, 1998.

ANDREEV, J.; BOROVSKY, Z.; ROSENSHINE, I.; ROTTEM, S. Invasion of HeLa cells by *Mycoplasma penetrans* and induction of tyrosine phosphorylation of a 145 kDa host cell protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.132, p. 189-194, 1995.

ARAL, S.; HOLMES, K.K. Social and behavioral determinants of the epidemiology of STDs: industrialized and developing countries. In: HOLMES, K. K. (Ed.). **Sexually transmitted diseases**. New York: McGraw-Hill, 1999, p. 39-76.

ASSUNÇÃO, P.; DIAZ, R.; COMAS, J.; de GALARRETA, C.M.R.; GONZÁLEZ-LLAMAZARES, O.R. Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* growth by flow cytometry. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 1047-1054, 2005.

ASSUNÇÃO, P.; ROSALES, R.S.; RIFATBEGOVIC, M.; ANTUNES, N.T.; de la FE, C.; de GALARRETA, C.M.R.; POVEDA, J.B. Quantification of mycoplasmas in broth medium with sybr green-I and flow citometry. **Front. Biosci.**, v. 11, p. 492-497, 2006.

BACON, O.; PECORARO, M.L.; GALVÃO, J.; PAGE-SHAFER, K. Country AIDS Policy Analysis Project. HIV/AIDS in Brazil, 2004. Disponível em: <<http://hivinsite.ucsf.edu/doc/ari-br.doc>> Acesso em: 02 mai. 2008.

BACZYNSKA, A.; FUNCH, P.; FEDDER, J.; KNUDSEN, H. J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Morphology of human fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* – *in vitro* organ culture study. **Hum. Reprod.**, v. 22, n. 4, p. 968-979, 2007.

BALISH, M. F.; KRAUSE, D. C. Cytoadherence and cytoskeleton. In: RAZIN, S. HERRMAN, R. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Plenum Press, 2002, p.491-518.

BARKER, J. R. **Cytological technique**. London: Methuon and Co., 1933.

BARILE, M.F.; ROTTEM, S. Mycoplasmas in cell cultures. In. KAHANE, I.; ADONI, A. (Ed.). **Diagnosis of Mycoplasmas**, New York: Plenum Press, 1993. p. 155-193.

BASEMAN, J.B.; BANAI, M.; KAHANE, I. Sialic acid residues mediate *Mycoplasma pneumoniae* attachment to human and sheep erythrocytes. **Infect. Immun.**, v.38, p.389-391, 1982

BASEMAN, J.B.; DALLO, S. F.; TULLY, J. G.; ROSE, D.L. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 2266-2269, 1988.

BASEMAN, J.B.; LANGE, M.; CRISCIAMAGNA, N.L.; GIRON, J. A.; THOMAS, S. A. Interplay between mycoplasmas and host target cells. **Microb. Pathog.**, v.19, p.105-116, 1995.

BASEMAN, J.B.; REDDY, S. P.; DALLO, S.F. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.154, p.137-144, 1996.

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

BASEMAN, J. B.; CAGLE, M.; KORTE, J. E.; HERRERA, C.; RASMUSSEN, W. G.; BASEMAN, J. G.; SHAIN, R.; PIPER, J. M. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 203-211, 2004.

BÉBÉAR, C. M.; RENAUDIN, H.; BRYSKIER, A.; BÉBÉAR, C. Comparative activities of telithromycin (HMR 3647), levofloxacin, and other antimicrobial agents against human mycoplasmas. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, p. 1980-1982, 2000.

BENCINA, D.; KLEVEN, S. H.; ELFAKI, M. G.; SNOJ, A.; DOVE, P.; DORRER, D.; RUSS, I. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. **Avian Pathol.**, v. 23, p. 19-36, 1994.

BJÖRNELIUS, E.; ANAGRIUS, C.; BOJS, G.; CARLBERG, H.; JOHANNISSON, G.; JOHANSSON, E.; MOI, H.; JENSEN, J. S.; LIDBRINK, P. Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia: a controlled clinical trial. **Sex. Trans. Infect.**, v. 84, n. 1, p. 72-76, 2008.

BLANCHARD, A.; BÉBÉAR, C. M. Mycoplasmas of humans. In.:RAZIN, S.; HERRMAN, R. (Ed). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer academic/Plenu publishers, 2002. p. 45-71.

BLAYLOCK, M.W.; MUSATOVOVA, O.; BASEMAN, J. G.; BASEMAN, J. B. Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.746- 752, 2004

BOATMAN, E. S. Morphology and ultrastruture of the mycoplasmatales. In: Razin, S.; Barile, M. F. (Ed). **The mycoplasmas**. New york: Academic press, 1979. v. 1, p. 63-102.

BONE, Q.; DENTON, E. J. The osmotic effects of electron microscope fixatives. The **J. Cell. Biol.**, v. 49, p. 571-581, 1971.

BOULOS, A.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. Antibiotic susceptibility of *Tropheryma whipplei* in MRC5 cells. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p. 747-752, 2004.

BOROVSKY, Z.; TARSHIS, M.; ZHANG, P.; ROTTEM S. Protein kinase C activation and vacuolation in HeLa cells invaded by *Mycoplasma penetrans*. **J Med Microbiol.**, v.47, p. 915-22, 1998.

BOVE, J. M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumoniae microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 239-45, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/DST (PN-DST/ AIDS), 2003. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/data/Pages>>. Acesso em: 16 maio 2007.

BRENNAN, P. C.; FEINSTEIN, R. N. Relationship of hydrogen peroxide production by *Mycoplasma pulmonis* to virulence for catalase - deficient mice. **J. Bacteriol.**, v. 98, p. 1036-1040, 1969.

BRENNAN, R. E.; SAMUEL, J. E. Evaluation of *Coxiella burnettii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p.1869-1874, 2003.

BUIM, M. R. **Mycoplasma synoviae**: diagnóstico, caracterização molecular e interação parasita – hospedeiro. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 25, p.169-193, 2000.

BUSTIN, S. A Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 29, p. 23-39, 2002.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clin. Sci.**, v. 109, p. 365-379, 2005.

CAMPOS, H. **Estatística experimental não paramétrica**. Piracicaba: ESALQ, 1983. 349 p.

CARABEO, R. A.; MEAD, D. J.; HACKSTADT. Golgi - dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, v. 100, p. 6771-6776, 2003.

CASSEL, G. H. et al. Mycoplasmal infections. In REMINGTON, J. S.; KELIN, J. O. (Ed). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4thed. Philadelphia: The W. B. Saunders Co, 1994. p. 619-656.

CHANDLER, D. K.; BARILE, M. F. Ciliostatic, hemagglutinating, and proteolytic activities in a cell extract of *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 1111-1116, 1980.

CHANDLER, D. K.; GRABOWSKI, M. W.; BARILE, M. F. *Mycoplasma pneumoniae* attachment: competitive inhibition by mycoplasmal binding component and by sialic acid-containing glycoconjugates. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 598-603, 1982.

CHANOCK, R. M.; DIENES, L.; EATON, M. D.; EDWARD, D. G.; FREUNDT, E. A.; HAYFLICK, L.; HERS, J. F. P.; JENSEN, K. E.; LIU, C.; MARMION, B. P.; MUFSON, M. A. SMITH, P. F.; SOMERSON, N. L.; TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma pneumoniae*, proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). **Science**, v. 140, p. 662, 1963.

CHAUSSEE, M. S.; COLE, R. L.; vanPUTTEN, J. P. M. Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by cultured mammalian cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3226-3232, 2000.

CHEN, J-R.; WENG, C-N.; HO, T-Y.; CHENG, I-C.; LAI, S-S. Identification of the copper-zinc superoxide dismutase activity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Microbiol.**, v.73, p. 301-310, 2000.

CHENG, X.; NICOLET, J.; MISEREZ, R.; KUHNERT, P.; KRAMPE, M.; PILLOUD, T.; ABDO, E.-M.; GRIOT, C.; FREY, J. Characterization of the gene for an immunodominant 72 kDa lipoprotein of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. **Microbiology**, v. 142, p. 3515-3524, 1996.

CHOWDHURY, I.H; MUNAKATA, T; KOYANAGI, Y; KOBAYASHI, S; ARAI, S; YAMAMOTO, N . Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro: a possible cofactor responsible for the progression of Aids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 170, n. 3, p: 1365-70, 1990

CLAUSEN, H.F.; FEDDER, J.; DRASBEK, M.; NIELSEN, P. K.; TOFT, B.; INGERLEV, H. J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. **Hum. Reprod.**, v.16, p. 1866-1874, 2001.

CLEVERDON, R.C.; MOROWITZ, H.J. Enumeration of Pleuropneumonia-like cultures. **J. Bacteriol.**, v.79, n.4, p. 615-616, 1960.

COBO, F.; STACEY, G. N.; HUNT, C.; CABRERA, C.; NIETO, A.; MONTES, R.; CORTÉS, J. L.; CATALINA, P.; BARNIE, A.; CONCHA, A. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 456-466, 2005.

COHEN, C.R.; MANHART, L. E.; BUKUSI, E. A.; ASTETE, S. G.; BRUNHAM, R. C.; HOLMES, K. K.; SINEL, S. K.; BWAYO, J. J.; TOTTEN, P. A. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. **Lancet**, v. 359, p. 765-766, 2002

COPPERMAN, R.; MORTON, H. E. Reversible inhibition of mitosis in lymphocyte cultures by non-viable Mycoplasma. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med.**, v. 123, p: 790-795, 1966.

DALLO, S. F.; CHAVOYA, A.; BASEMAN, J. B. Characterization of the gene for a 30-kilodalton adhesion-related protein of *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 4163-4165, 1990.

DALLO, S. F.; BASEMAN, J. B. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. **Microb. Pathogen.**, v. 29, p. 301:309, 2000.

DALLO S. F.; KANNAN, T. R.; BLAYLOCK, W.; BASEMAN, J. B. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 1041-1051, 2002.

DEDIEU, L.; CHAPEY, E.; BALCER-RODRIGUES, V. *Mycoplasma mycoides* ssp. *Mycoides* biotype small colony-secreted components induce apoptotic cell death in bovine leucocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 62, p. 528-538, 2005.

DeVRIES, F. P.; van der ENDE, A.; van PUTTEN, J. P. M.; DANKERT, J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2998-3006, 1996.

DEGUSHI, T.; MAEDA, S. *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of nongonococcal urethritis. **J. Urol.**, v. 167, p. 1210-1217, 2002.

DEGUSHI, T.; YOSHIDA, T.; YOKOI, S.; ITO, M.; TAMAKI, M.; ISHIKO, H.; MAEDA, S. Longitudinal quantitative detection by real-time PCR of *Mycoplasma genitalium* in first-pass urine of men with recurrent nongonococcal urethritis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3854-3856, 2002.

DESAI, N. N.; KENNARD, E. A.; KNISS, D. A.; FRIEDMAN, C. I. Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. **Fertil Steril.**, v. 61, p. 760-766, 1994.

DESSI, D.; DELOGU, G.; EMONTE, E.; CATANIA, M. R.; FIORI, P. L.; RAPPELLI, P. Long term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoa in transmitting bacterial infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1180-1186, 2005.

DHANDAYUTHAPANI, S.; RASMUSSEN, W. G.; BASEMAN, J. B. Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, p. 5227-5232, 1999.

DHANDAYUTHAPANI, S.; BLAYLOCK, W.; BEBEAR, C. M.; RASMUSSEN, W. G.; BASEMAN, J. B. Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5645-5650, 2001.

DIENES, L.; EDSALL, G. Observations on the L-organism of Klieneberger. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 36, p. 740-744, 1937.

DIESBACH, P.; N'KULI, F.; DELMÉE, M.; COURTOY, P. J. Infection by *Mycoplasma hyorhinis* strongly enhances uptake of antisense oligonucleotides: a reassessment of receptor-mediated endocytosis in the HepG2 cell line. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n.3, p. 886-892, 2003.

DIRKSEN, L. B.; PROFT, T.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; HERRMANN, R.; KRAUSE, D. C. Nucleotide sequence analysis and characterization of the *hmv* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. **Gene**, v. 171, p. 19-25, 1996.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Contamination of cell culture, Mycoplasma, In: DREXLER, H.G. (Ed.). **The leukemia lymphoma cell lines Factsbook**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 609-627.

DUENSING, T. D.; vanPUTTEN, J. P. M. Vitronectin binds to gonococcal adhesion OpaA through a glycosaminoglycan molecular bridge. **Biochemistry**, v. 334, p. 133-139, 1998.

DUENSING, T. D.; WING, J. S.; vanPUTTEN, J. P. M. Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4463-4468, 1999.

DZIEWANOWSKA, K.; PLATT, J. M.; DEOBALD, C. F.; BAYLES, K. W.; TRUMBLE, W. R.; BOHACH, G. A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4673-4678, 1999.

EATON, M. D.; MEIKEJOHN, G.; VAN HERICK, W. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia, a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. **J. Exp. Med.**, v. 79, p. 649-667, 1944.

ELSINGHORST, E. A. 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. **Methods Enzymol.**, v. 236, p. 405-420, 1994.

FALK L.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium* prevalence, symptoms, signs and treatment efficacy among attendees at Swedish STD outpatient clinic. **Int. J. STD AIDS.**, v. 12, p. 107, 2001. Supplement 2, International Congress of Sexually Transmitted Infections, 24-27, 2001

FALK, L.; FREDLUND, H.; JENSEN, J. S Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. **Sex. Transm. Infect.**, v. 79, p. 318-319, 2003.

FALK, L.; FREDLUND, H.; JENSEN, J. S. Symptomatic urethritis is more prevalent in men infected with *Mycoplasma genitalium* than with *Chlamydia trachomatis*. **Sex. Transm. Infect.**, v. 80, p. 289-293, 2004.

FALK, L.; FREDLUND, H.; JENSEN, J. S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 73-78, 2005.

FENG, S. H.; TSAI, S.; RODRIGUEZ, J.; LO, S. C. Mycoplasma infections prevent apoptosis and induce malignant transformation of interleukin-3-dependent 32D hematopoietic cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 7995-8002, 1999.

FERRIS, S.; WATSON, H. L.; NEYROLLES, O.; MONTAGNIER, L.; BLANCHARD, A. Characterization of a major *Mycoplasma penetrans* lipoprotein and its gene. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 130, p. 313-320, 1995.

FENSKE, J.D.; KENNY, G.E. Role of arginine deiminase in growth of *Mycoplasma hominis*. **J. Bacteriol.**, v. 126, p. 501-510, 1976.

FORTENBERRY, J. D.; BRIZENDINE, E. J.; KATZ, B. P.; WOOLS, K. K.; BLYTHE, M. J.; ORR, D. P. Subsequent sexually transmitted infections among adolescent women with genital infection due to *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, or *Trichomonas vaginalis*. **Sex. Transm. Dis.**, v. 26, p. 26-32, 1999.

FRASER, C. M.; GOCAYANE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUICIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON C. A.; VENTER, J. C. The minimal gene of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 397-403, 1996.

FRANZOSO, G.; DIMITROV, D. S.; BLUMENTHAL, R.; BARILE, M. F.; ROTTEM, S. Fusion of *Mycoplasma fermentans* strain incognitos with T - lymphocytes. **FEBS**, v. 303, p. 251-254, 1992.

GABRIDGE, M. G.; MURPHY, W. G. Toxic membrane fractions from *Mycoplasma fermentans*. **Infect. Immun.**, v. 4, p. 678-682, 1971.

GABRIDGE, M.; JOHNSON, C. K.; CAMERON, A. M. Cytotoxicity of *Mycoplasma pneumonia* membranes. **Infect. Immun.**, v. 10, n. 5, p. 1127-1134, 1974.

GABRIDGE, M. G.; YIP, D.; HEDGES, K. Levels of lysosomal enzymes in tissue of mice infected with *Mycoplasma fermentans*. **Infect. Immun.**, v. 12, n. 2, p. 233-239, 1975.

GABRIDGE, M. G.; SCHNEIDER, P. R. Cytotoxic effect of *Mycoplasma fermentans* on mouse thymocytes. **Infect. Immun.**, v. 11, n. 3, p. 460-465, 1975.

GALAN, J. E.; ZHOU, D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 8754-8761, 2000.

GARCÍA, M.; ELFAKI, M. G.; KLEVEN, S. H. Analysis of the variability in expression of *Mycoplasma gallisepticum* surface antigens. **Vet. Microbiol.**, v. 42, p. 147-158, 1994.

GARNER, C. M.; HUBBOLD, L. M.; CHAKRABORTI, P. R. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 57, p. 295-301, 2000.

GEARY, S. J.; TOURTELLOTTE, M. E.; CAMERON, J. A. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: isolation and characterization. **Science**, v. 212, p. 1032-1033, 1981.

GEARY, S. J.; WALCZAK, E. M. Cytopathic effect of whole cells and purified membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 1, p. 132-136, 1983.

GEARY, S. J.; WALCZAK, E. M. Isolation of a cytopathic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, p. 576-578, 1985.

GIRÓN, J. A.; LANGE, M.; BASEMAN, J. B. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 197-208, 1996.

GOH, M. S.; GORTON, T. S.; FORSYTH, M. H.; TROY, K. E.; GEARY, S.J. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytidhesin (GapA). **Microbiology**, v. 144, p. 2071-2078, 1998.

GOULET, M.; DULAR, R.; TULLY, J.G.; BILLOWES, G.; KASATIYA, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2923-2925, 1995.

GRAU, O.; TUPPIN, P.; SLIZEWICS, B.; LAUNAY, V.; GOJJARD, C.; BAHRAOI, E.; DELFRAISSY, J. F.; MONTAGNIER, L. A longitudinal study of seroreactivity against *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected homosexual men: association with disease progression. **Aids Res. Hum. Retroviruses**. V. 14, n. 8, p. 661-7, 1998

HACKSTADT, T.; SCIDMORE, M. A.; ROCKEY, D. D. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis* - infected cells: directed trafficking of Golgi - derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 4877-4881, 1995.

HACKSTADT, T.; ROCKEY, D. D.; HEINZEN, A.; SCIDMORE, M. A. *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from Golgi apparatus to the plasma membrane. **EMBO J.**, v. 15, p. 964-977, 1996.

HALL, R. E.; AGARWAL, S.; KESTLER, D. P. Induction of leukemia cell differentiation and apoptosis by recombinant P48, a modulins derived from *Mycoplasma fermentans*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 269, p. 284-289, 2000.

HAMASUNA R.; OSADA, Y.; JENSEN, J. S. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' nuclease real-time PCR. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 4993-4998, 2005.

HAUCK, C. R. Cell adhesion receptors – signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 191, p. 55-61, 2002.

HAUCK, C. R.; MEYER, T. F. “Small”talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria* – host - cell communication. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 43-49, 2003.

HERRMANN, R.; REINER, B. *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*: a comparison of two closely related bacterial species. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 572-579, 1998.

HERRMANN, R.; GÖHLMANN, H. W. H.; REGULA, J. T.; WEINER, J. III; PIRKL, E.; UEBERLE, B.; FRANK, R. Mycoplasmas, the smallest known bacteria. In: GÖBEL, U. B.; RUFF B.R. (Ed.). **Microbial Evolution and Infection**. Reinbeck, Germany: Einhorn-Press, Verlag, 1999. p. 71-79.

HIMMELREICH, R.; PLAGENS, H.; HILBERT, H.; REINER, B.; HERRMANN, R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 701-712, 1997.

HJORTH, S.V.; BJÖRNELIUS, E.; LIDBRINK, P.; FALK, L.; DOHN, B.; BERTHELTSEN, L.; MA, L.; MARTIN, D.H.; JENSEN, J.S. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 2078-2083, 2006.

HOOTON, T. M.; ROBERTS, M. C.; ROBERTS, P. L.; HOLMES, K. K.; STAMM, W. E.; KENNY, G. E. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* determined by DNA probe in men with urethritis. **Lancet**, v. 1, n. 8580, p. 266-268, 1988.

HORNER, P. J.; GILROY, C. B.; THOMAS, B. J.; NAIDOO, R. O.; TAYLOR-ROBINSON, D. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. **Lancet**, v. 342, n. 8871, p. 582-585, 1993.

HORNER, P.; THOMAS, B.; GILROY, C. B.; EGGER, M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 995-1003, 2001.

HOUSHAYMI, B. M.; MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. Oxidation of glycerol differentiates African from European isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *Mycoides* SC (small colony). **Vet. Rec.**, v. 140, p. 182-183, 1997.

HU, P. C.; COLLIER, A. M.; BASEMAN, J. B. Alterations in the metabolism of hamster tracheas in organ culture infections by virulent *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 11, p. 704-710, 1975.

HUDSON, P.; GORTON, T.S.; PAPAIZISI, L.; CECCHINI, K.; FRASCA Jr., S.; GEARY, S.J. Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (*lpd*), in *Mycoplasma gallisepticum* through in vivo screening of transposon mutants. **Infect. Immun.**, v.74, n.2, p. 931-939, 2006.

HUNFELD, K-P; BITTNER, T.; RÖDEL, R.; BRADE, V.; CINATL, J. New real-time PCR-based method for in vitro susceptibility testing of *Anaplasma phagocytophilum* against antimicrobial agents. **Int. J. Antimicrob. Agents** v. 23, p. 563-571, 2004.

INAMINE, J. M.; DENNY, T. P.; LOECHEL, S.; SHARPER, U., HUANG, C. H.; BOTT, K. F.; HU, P. C. Nucleotide sequence of the P1 attachment-protein gene of *Mycoplasma pneumoniae*. **Gene**, v. 64, p. 217-229, 1988.

INTO, T.; OKADA, K.; INOUE, N.; YASUDA, M.; SHIBATA, K-I Extracellular ATP regulates cell death of lymphocytes and monocytes induced by membrane-bound lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma salivarium*. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, n. 10, p. 667-675, 2002.

IVERSON-CABRAL, S. L.; ASTETE, S. G.; COHEN, C. R.; ROCHA, E. P.; TOTTEN, P. A. Intrastrain heterogeneity of the *mgpB* gene in *Mycoplasma genitalium* is extensive *in vitro* and *in vivo* and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 3715, 2006.

IZRAELI, S.; PFLEIDERER, C.; LION, T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. **Nucleic Acids. Res.**, v. 19, p. 6051, 1991.

JENSEN, J.S.; BLOM, J.; LIND, K. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 75, p. 91-98, 1994.

JENSEN, J. S; HANSEN, H. T.; LIND, K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 286-291, 1996.

JENSEN, J.S.; BJÖRNELIUS, E.; DOHN, B.; LIDBRINK, P. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. **Sex. Transm. Dis.**, v. 31, n. 8, p. 499-507, 2004a.

JENSEN, J.S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. **JEADV**, v. 18, p. 1-11, 2004b.

JENSEN, J.S.; BJORNELIUS, E.; DOHN, B.; LIDBRINK, P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 683-692, 2004c.

JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium* infections. **Dan. Med. Bull.** v. 53, p. 1-27, 2006.

JOHANNISSON, G.; ENSTRÖM, Y.; LÖWHAGEN, G. B.; NAGY, V.; RYBERG, K.; SEEBERG, S.; WELINDER-OLSSON, C. Occurrence and treatment of *Mycoplasma genitalium* in patients visiting STD clinics in Sweden. **Int. J. STD AIDS**, v. 11, p. 324-326, 2000.

JOHNSON, D. F. **GraphPad inStat tm Software**, version 2.0. Rutgers University: New Jersey, 1990-1993.

JURSTRAND M.; JENSEN, J. S.; FREDLUND, H.; FALK, L.; MOLLING, P. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 23-29, 2005.

KANNAN, T. R.; BASEMAN, J. B. Hemolytic and hemoxidative activities in *Mycoplasma penetrans*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 11, p. 6419-6422, 2000.

KANNAN, T.R.; BASEMAN, J. B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. **PNAS**, v. 103, n. 17, p. 6724-6729, 2006.

KEANE, F. E.; THOMAS, B. J.; GILROY, C. B.; RENTON, A.; TAYLOR-ROBINSON, D. The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* with non-gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners. **Int. J. Std Aids**, v. 11, p. 435-439, 2000.

KELTON, W.H. Growth-curve studies of Pleuropneumonia-like Organism. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 79, p. 422-429, 1960.

KELTON, W.H. Synchronized division of Avian Pleuropneumonia-like Organisms. **J. Bacteriol.**, v. 83, n. 5, p. 948-955, 1962.

KIRCHOFF, H.; ROSENGARTEN, R.; LOTZ, W.; FISCHER, R. M.; LOPATTA, D. Flask-shaped mycoplasmas: properties and pathogenicity for man and animals. **Isr. Med. Sci.**, v. 20, p. 848-853, 1984.

KLAINER, A. S.; BETSCH, C. J. Scanning-beam electron microscopy of selected microorganisms. **J. Infect. Dis.**, v. 121, p. 339-343, 1970.

KOKOTOVIC, B.; FRIIS, N. F.; JENSEN, J. S.; AHRENS, P. Amplified – fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3300-3307, 1999.

KRAUSE, D. C.; LEITH, D. K.; WILSON, R. M.; BASEMAN, J. B. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 809-817, 1982.

KRAUSE, D. C.; CHEN, Y. Interaction of *Mycoplasma pneumoniae* with HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 8, p. 2054-2059, 1988.

KRAUSE, D. C.; TAYLOR – ROBINSON, D. Mycoplasmas which infect humans. In: MANILOFF, J.; McELHNEY, R. C.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1992. p. 417-444.

KRAUSE, D. C. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unraveling the tie that binds. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 247-253, 1996.

KRIEG, R.C.; DONG, Y.; SCHWAMBORN, K.; KNUECHEL, R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.65, p. 13-19, 2005.

KUBISTA, M.; STAHLBERG, A.; BAR, T. Light-up probe based real-time Q-PCR. p. 53-58 In: RAGHAVACHARI, R.; TAN, W. (Ed.). **Genomics and Proteomics Technologies**. Proceedings of SPIE, 2001, v. 4264, p. 53-58.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.**, v. 27, p. 95-125, 2006.

LÄHTEENMÄKI, K.; EDELMAN, S.; KORHONEN, T. K. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 79-85, 2005.

LAM, K. M. Morphologic changes in chicken cells after in vitro exposure to *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian. Dis.**, v. 48, n. 3, p. 488-493, 2004.

LECUIT, M.; DRAMSI, S.; GOTTARDI, C.; FEDOR-CHAIKEN, M.; GUMBINER, B.; COSSART, P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **EMBO J.**, v. 18, p. 3956-3963, 1999.

LEVISOHN, S.; DYKSTRA, M. J.; LIN, M. Y.; KLEVEN, S. H. Comparison of in vivo and in vitro methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection. **Avian Pathol.**, v. 15, p. 233-246, 1985.

LEVISOHN, S.; ROSENGARTEN, R.; YOGEV, D. *In vivo* variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. **Vet. Microbiol.**, v. 45, p. 219-231, 1995.

LINKER, C.; WILSON, T.H. Cell volume regulation in *Mycoplasma gallisepticum*. **J. Bacteriol.**, v.163, p. 1243-1249, 1985.

LIU, T.; GARCÍA, M.; LEVISOHN, S.; YOGEV, D.; KLEVEN, S. H. Molecular variability of the adhesin-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 1882-1888, 2001.

LO, S. C.; HAYES, M.M.; WANG, R. Y.; PIERCE, P. F.; KOTANI, H.; SHIH, J. W. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. **Lancet**, v. 338, p. 1415-1418, 1991.

LO, S. C.; WEAR, D. J.; SHIH, J. W.; WANG, R. Y.; NEWTON, P. B.; RODRIGUEZ, J. F. Fatal systemic infections of nonhuman primates by *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain). **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. S283-288. 1993a. Suppl 1.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; WEAR, D. J.; NEWTON, P. B. 3rd.; TULLY, J. G.; SHIH, J. W. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. **Mod. Pathol.**, v. 6, p. 276-280, 1993b.

LOW, I.E.; EATON, M.D. Replication of *Mycoplasma pneumoniae* in broth culture. **J. Bacteriol.**, v. 89, p. 725-728, 1965.

2001LO, S. C. Mycoplasmas in AIDS. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: Molecular biology and Pathogenesis**. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol, 1982. p. 525-548.

LUKI, N.; LEBEL, P.; BOUCHER, M.; DORAY, B.; TURGEON, J.; BROUSSEAU, R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.17, p. 255-263, 1998.

MA, L.; MARTIN, D. H. Single – nucleotide polymorphism in the rRNA operon and variable numbers of tandem repeats in the lipoprotein gene among *Mycoplasma genitalium* strains from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4876–4878, 2004.

MAEDA, S.; TAMAKI, M.; KOJIMA, K.; YOSHIDA, T.; ISHIKO, H.; YASUDA, M.; DEGUCHI, T. Association of *Mycoplasma genitalium* persistence in the urethra with recurrence of nongonococcal urethritis. **Sex. Transm. Dis.**, v. 28, p. 472-475, 2001.

MAHONY, J. B. Chlamydiae host cell interaction revealed using DNA microarrays. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 975, p. 192-201, 2002.

MANHART, L. E.; CRITCHLOW, C. W.; HOLMES, K. K.; DUTRO, S. M.; ESCHENBACH, D. A.; STEVENS, C. F.; TOTTEN, P. A. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 650-657, 2003.

MANILOFF, J. Use of blood agar plates to study mycoplasma physiology. **Microbios**, v.1, p. 125-135, 1969.

MANILOFF, J.; MOROWITZ, H.J. Cell biology of mycoplasmas. **Bacteriol. Rev.**, v. 36, p. 263-290, 1972.

MARKHAM, P. F.; GLEW, M. D.; BROWNING, G. F.; WHITHEAR, K. G.; WALKER, I. D. Expression of two members of the pMGA gene family of *Mycoplasma gallisepticum* oscillates and is influenced by pMGA-specific antibodies. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2845-2853, 1998.

MARMION, B. P.; GOODBURN, G. M. Effect of an inorganic gold salt on Eaton's primary atypical pneumonia agent and other observations. **Nature**, v. 189, p. 247-248, 1961.

MARTINELLI, F.; GARRAFA, E.; TURANO, A.; CARUSO. Increased frequency of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in AIDS patients without urethral symptoms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2042-2044, 1999.

MARTIN, H. L.; RICHARDSON, B. A.; NYANGE, P. M.; LAVREYS, L.; HILLIER, S. L.; CHOCHAN, B.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; BWAYO, J.; KREISS, J. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type I and sexually transmitted disease acquisition. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1863-1868, 1999.

MAUNSBACH, A. B.; MADDEN, S. C.; LATTA, H. Variations in fine structure of renal tubular epithelium under different conditions of fixation. **J. Ultrastruct. Res.**, v.6, p. 511-530, 1962.

MAUNSBACH, A. B. The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. II. Effect of varying osmolarity, ionic strength, buffer system, and fixative concentration of glutaraldehyde solutions. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 15, p. 283-309, 1966.

McAULIFFE, L.; ELLIS, R. J.; MILES, K; AYLING, R. D.; NICHOLAS, R. A. J. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. **Microbiology**, v. 152, p. 913-922, 2006.

McGARRITY, G. J.; VANAMAN, V.; SARAMA, J. Cytogenetic effect of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. **In vitro**, v. 20, p. 1-18, 1984.

McGARRITY, G. J.; KOTANI, H.; BUTLER, G. H. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1992, p. 445-454.

McORIST, S. Obligate intracellular bacteria and antibiotic resistance. **Trends Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 483-486, 2000.

McSWEENEY, L. A.; DREYFUS, L. A. Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. **Cell Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 447-458, 2004.

MENGAUD, J.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MEGE, R. M.; COSSART, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v. 84, p. 923-932, 1996.

MERNAUGH, G. R.; DALLO, S. F.; HOLT, S. C.; BASEMAN, J. B. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. **Clin Infect Dis.** v. 17 p. S69-78, 1993, Suppl. 1.

MESEGUER, M. A.; ALVAREZ, A.; REJAS, M. T.; SANCHEZ, C.; PEREZ-DIAS, J. C.; BAQUERO F. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. **Infect. Genet. Evol.**, v. 3, p. 47-55, 2003.

MERNAUGH, G. R.; DALLO, S. F.; HOLT, S. C.; BASEMAN, J. B. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. S69-78, 1993. Suppl 1.

MEUR, S.K.; SIKDAR, A.; SRIVASTAVA, N.C.; SRIVASTAVA, K.K. Rapid photometric assay of growth of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 301-302, 1989.

MEYER, R. D.; CLOUGH, W. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults: emphasis on immunosuppression. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, n.1, p. 243-249, 1993.

MIDDLETON, A. M.; CHADWICK, M. V.; NICHOLSON, A. G.; DEWAR, A.; FELDMAN, C.; WILSON, R. Investigation of mycobacterial colonisation and invasion of the respiratory mucosa. **Thorax**, v. 58, p. 246-251, 2003.

MILES, R. J.; TAYLOR, R. R.; VARSANI, H. Oxygen uptake and H₂O₂ production by fermentative *Mycoplasma* spp. **Med. Microbiol.**, v. 34, p. 219-223, 1991.

MILES, R.J. Cell nutrition and growth. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American society for microbiology, 1992. p. 23-40.

MILLER, R. A.; BRITIGAN, B. E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 1-18, 1997.

MIZUTANI, T.; FUKUSHI, S.; KENRI, T.; SASAKI, Y.; ISHII, K.; ENDOH, D.; ZAMOTO, A.; SAIJO, M.; KURANE, I.; MORIKAWA, S. Enhancement of cytotoxicity against Vero cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. **Ach. Virol.**, v. 152, p. 1019-1025, 2007.

MIYAZAKI, K.; TAKAKU, H.; UEDA, M.; FUJITA, T.; HUANG, W. D.; KIMURA, T.; YAMASHITA, J.; HORIO, T. Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a Mycoplasma-infected cell line. **Cancer Res.**, v. 50, p: 4522-4527, 1990.

MINSKY, M. Memoir on inventing in the confocal microscope. **Scanning**, v. 10. p. 128-138, 1988.

MOLLER, B.R.; TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P. M. Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. **Lancet**, v.1 n.8386, p. 1102-1103, 1984.

MOMYNALIEV, K. T.; ORLOVA, V. F.; ZHUKOTSKII, A. V.; KOGAN, E. M.; GOVORUM, V. M. The use of in situ polymerase chain reaction for detection the intracellular localization of *Mycoplasma hominis* in cultured HeLa cells. **Tsitologiya**, v. 42, p. 202-208, 2000.

MONTAGNIER, L.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas as cofactors in infection due to the human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** v. 17, p. S309-15, 1993. Suppl. 1.

MOORTHY, A. R. S.; SPRADBROW, P. B. The effect of mycoplasmas and acholeplasmas of equine origin on organ cultures of chicken-embryo trachea. **J. Comp. Path.**, v. 95, p. 209-216, 1985.

MOROWITZ, H. J. Foreword: from the enigmatic pleuropneumonia-like organism to the paradigmatic mycoplasma. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. V-VIII.

MOROZUMI, M.; ITO, A.; MURAYAMA, S. Y.; HASEGAWA, K.; KOBAYASHI, R.; IWATA, S.; KAWAMURA, N.; KUROKI, H.; NAKAYAMA, E.; TAJIMA, T.; UBUKATA, K. Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. **Can. J. Microbiol.** v. 52, n. 2, p. 125-129, 2006.

MUCH, P.; WINNER, F.; STIPKOVITS, L.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. *Mycoplasma gallisepticum*: Influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 181-186, 2002.

MUSATOVOVA, O.; HERRERA, C.; BASEMAN, J. B. Proximal region of the gene encoding cytoadherence – related protein permits molecular typing of *Mycoplasma genitalium* clinical strains by PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 598-603, 2006.

NASCIMENTO, C. M. O.; FIGUEIREDO, C. A.; TIMENETSKY, J. Sensitivity of rabbit fibrochondrocytes to mycoplasmas. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 243-246, 2002.

NICOLSON, G. L.; GAN, R.; HAIR, J. Multiple co-infections (Mycoplasma, Chlamydia, human herpes virus-6) in blood of chronic fatigue syndrome patients: association with signs and symptoms. **APMIS**, v.111, p. 557-566, 2003.

NIELSEN, M. H. The ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donnè before and after transfer from vaginal secretion to diamonds medium. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 83, p. 381-389, 1975.

NOCARD, E.; ROUX, E. R. Le microbe de la pleuropneumoniae. **Ann. Inst. Pasteur**, v.12, p. 240-262, 1898.

NUNOYA, T.; TAJIMA, M.; YAGIHASHI, T. Decrease in catalase activity of cultured cells by *Mycoplasma gallisepticum* infection. **Vet. Microbiol.**, v. 13, n. 4, p. 343-351, 1987.

OLYMPUS LATINO AMÉRICA. Disponível em:
<<http://www.olympuslatinoamerica.com>> . Acesso em: 16 maio 2007.

PADDENBERG, R.; WEBER, A.; WULF, S.; MANNHERZ, H. G. Mycoplasma nucleases able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases. **Cell Death Differ.**, v. 5, p. 517-528, 1998.

PALMER, L. M.; REILLY, T. J.; UTSALO, S. J.; DONNENBERG, M. S. Internalization of *Escherichia coli* by human renal epithelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 7, p. 2570-2575, 1997.

PANGALA, V. S.; WINTER, A. J.; WIJESINHA, A.; FOOTE, R. H. Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovigenitalium*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 42; p. 2090-2093, 1981.

PAPAZISI, L.; TROY, K. E.; GORTON, T. S.; LIAO, X.; GEARY, S. J. Analysis of cytoadherence – deficient, GapA – negative *Mycoplasma gallisepticum* strain R. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6643-6649, 2000.

PATON, G. R.; JACOBS, J. P.; PERKINS, F. T. Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with mycoplasma. **Nature**, v. 207, p. 43-45, 1965.

PERSSON, A.; JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L.; JOHANSSON, K. E.; POUMARAT, F. Variable surface protein Vmm of *Mycoplasmas mycoides* subsp. *Mycoides* small colony type. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 3712-3722, 2002.

PETERSON, S. N.; HU, P. C.; BOTT, K. F.; HUTCHISON, C. A. 3rd. A survey of the *M. genitalium* genome by using random sequencing. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7918-7930, 1993.

PETERSON, S. N.; BAILEY, C. C.; JENSEN, J. S.; BORRE, M. B.; KING, E. S.; BOTT, K. F.; HUTCHISON, C. A. Characterization of repetitive DNA in the *Mycoplasma genitalium* genome: possible role in the generation of antigenic variation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, p. 11829-11833, 1995.

PEREZ, G.; SKURNICK, J. H.; DENNY, T. N.; STEPHENS, R.; KENNEDY, C. A.; REGIVICK, N.; NAHMIAS, A.; LEE, F. K.; LO, S. C.; WANG, R. Y.; WEISS, S. H.; LOURIA, D. B. Herpes simplex type II and *Mycoplasma genitalium* as risk factors for heterosexual HIV transmission: report from the heterosexual HIV transmission study. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 5-11, 1998.

PICH, O.Q.; BURGOS, R.; FERRER-NAVARRO, M.; QUEROL, E.; PIÑOL, J. *Mycoplasma genitalium* mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytoadherence. **Mol. Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 1509-1519, 2006.

PILO, P.; VALEI, E. M.; PETERHANS, E.; BONVIN-KLOTZ, L.; STOFFEL, M. H.; DOBBELAERE, D.; FREY, J. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* Small Colony. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 6824-6831, 2005.

PILS, S.; SCHMITTER, T.; NESKE, F.; HAUCK, C. R. Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry. **J. Microbiol. Methods**. v. 65, p. 301-310, 2006.

PINGMIN, W.; YUEPU, P.; JIWEN, Z. Prevalence survey on condom use and infection of urogenital mycoplasmas in female sex workers in China. **Contraception**, v. 72, p. 217-220, 2005.

PODDAR, A. S.; KIM, J. G.; GILL, K. P.; BATES, B. N.; SANTANAM, N. S.; ROCK, J. A.; MURPHY, A. A.; PARTHASARATHY, S. Generation and characterization of a polyclonal antipeptide antibody to human glycodelin. **Fertil. Steril.**, v. 69, p. 543-548, 1998.

POTTS, J. M.; SHARMA, R.; PASQUALOTTO, F.; NELSON, D.; HALL, G.; AGARWAL, A. Association of *Ureaplasma urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. **J. Urol.**, v. 163, p. 1775-1778, 2000.

PROFT, T.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; HERRMANN, R. The P200 protein of *Mycoplasma pneumoniae* shows common features with the cytoadherence-associated proteins HMW1 and HMW3. **Gene**, v. 171, p. 79-82, 1996.

PURCELL, R.H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; WONG, D.; CHANOCK, R.M. Color test for the measurement of antibody to T-strain Mycoplasmas. **J. Bacteriol.**, v. 92, p. 9-12, 1966.

RACHMILEWITZ, E. A.; SHIFTER, A.; KAHANE, I. Vitamin E deficiency in beta-thalassemia major. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 1850-1858, 1979.

RAPPELLI, P.; ADDIS, M. F.; CARTA, F.; FIORI, P. L. *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. **Lancet**, v. 352, p. 1286, 1998.

RAPPELLI, P.; ADDIS, M. F.; CARTA, F.; FIORI, P. L. Exploring a novel perspective on pathogenic relationships: response. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 98, 1999.

RAZIN, S.; COSENZA, B.J. Growth phases of *Mycoplasma* in liquid media observed with phase-contrast microscope. **J. Bacteriol.**, v. 91, p. 858-869, 1966.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 42, n. 2, p. 414-470, 1978.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Mycoplasma adhesion. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 407-422, 1992a.

RAZIN, S. Mycoplasma Taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American society for microbiology, 1992b. p. 3-22.

RAZIN, S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. **Mol. Cell. Probes**, v. 8, p. 497-511, 1994.

RAZIN, S. Molecular properties of Mollicutes: A synopsis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and Diagnosis procedures in Mycoplasma**. San Diego: Academic Press, 1995. v. 1, p. 1-25.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 1094-1156, 1998.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

RAWADI, G.; ROMAN-ROMAN, S.; CASTEDO, M.; DUTILLEUL, V.; SUSIN, S.; MARCHETTI, P.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Effects of *Mycoplasma fermentans* on the myelomonocytic lineage. Different molecular entities with cytokine-inducing and cytotoxic potential. **J. Immunol.**, v. 156, p. 670-678, 1996.

REDDY, S.P.; RASMUSSEN, W. G.; BASEMAN, J. B. Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 15, p. 199-211, 1996.

RENAUDIN, H.; TULLY, J. G.; BÉBÉAR, C. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* to antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 870-872, 1992.

RICE, P.; HOUSHAYMI, B. M.; ABU-GROUN, E. A.; NICHOLAS, R. A.; MILES, R. J. Rapid screening of H₂O₂ production by *Mycoplasma mycoides* and differentiation of European subsp. *mycoides* SC (small colony) isolates. **Vet Microbiol.** v. 78, n. 4, p. 343-351, 2001.

ROBERTSON, J.; GOMERSALL, M.; GRILL, P. *Mycoplasma hominis*: growth, reproduction, and isolation of small viable cells. **J. Bacteriol.** v. 124, n. 2, p. 1007-1018, 1975.

ROBERTSON, J.A. Bromothymol blue broth: improved medium for detection of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma). **J. Clin. Microbiol.**, v.7, p. 127-132, 1978.

ROBERTSON, J.A.; ALFA, M.; BOATMAN, E.S. Morphology of the cells and colonies of *Mycoplasma hominis*. **Sex. Transm. Dis.**, p. 232-239, 1983. Supl. 10.

ROBERTSON, J. A.; STEMKE, G. W. Measurement of Mollicutes growth by ATP - dependent luminometry. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Ed.). **Molecular and Diagnostic procedures in Micoplasmology**. New ypor: Academic Press, 1995, p. 65-71.

ROCH, N.; MAURIN, M. Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determinate by real-time PCR assay. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 55, p. 866-871, 2005.

RODWELL, A. W.; WHITCOMB, R. F. Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmology: mycoplasmas characterization**. New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 185-196.

ROLAIN, J. M.; STUHL, L.; MAURIN, M.; RAOULT, D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by quantitative PCR DNA assay. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p. 2747-2751, 2002.

ROLAIN, J. M.; MALLET, M. N.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 54, p. 538-541, 2004.

ROGERS, M.J.; SIMMONS, J.; WALKER, R. T.; WEISBURG, W. G.; WOESE, C. R.; TANNER, R. S.; ROBINSON, I. M.; STAHL, D. A.; OLSEN, G.; LEACH, R. H. Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5SrRNA sequence data. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, p. 1160-1164, 1985.

ROSE, B. I.; SCOTTE, B. Sperm motility, morphology, hyperactivation and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. **Fertil. Steril.**, v. 61, p. 341-348, 1994.

ROSENGARTEN, R.; BEHRENS, A.; STETEFELD, A.; HELLER, M.; AHRENS, M.; SACHSE, K.; YOGEV, D.; KIRCHHOFF, H. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1094-1156, 1994.

ROSENGARTEN, R.; YOGEV, D. Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species diagnosis and strain standardization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 149-158, 1996.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host by mycoplasmas. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 436-440, 1998.

ROTTEM, S.; YOGEV, D. Mycoplasma interaction with host eukaryotic cells. In: OELSCHLAEGER, T. A.; HACKER, J. (Ed.). **Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells (Subcellular Biochemistry)**. New York: Plenum Press, 2000. p. 199-228.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 417-432, 2003.

RUITER, M.; WENTHOLF, H.M.M. The occurrence of a pleuropneumonia-like organism in fuso-spillary infections of the human genital mucosa. **Ivest. Dermatol.**, v. 18, P. 313-25, 1952.

RUTLEDGE, R. G.; COTE, C. Mathematics of quantitative PCR and the applications of standard curves. **Nucleic Acids Res.**, v.31 ed.93. 2003.

SACHSE, K.; HELBIG, J. H.; LYSNYANSKY, I.; GRAJETZKI, C.; MULLER, W.; JACOBS, E.; YOGEV, D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable lipoproteins. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 680-687, 2000.

SAED ABDUL-WAHAB, O.M.; ROSS, G.; BRADBURY, J.M. Pathogenicity and cytoadherence of *Mycoplasma imitans* in chicken and duck embryo tracheal organ cultures. **Infect. Immun.**, v.64, n. 2, p. 563-568, 1996.

SAINI, A. K.; MAITHAL, K.; CHAND, P.; CHOWDHURY, S.; VOHRA, R.; GOYAL, A.; DUBEY, G. P.; CHOPRA, P.; CHANDRA, R.; TYAGI, A. K.; SINGH, Y.; TANDON, V. Nuclear localization and in situ DNA damage by *Mycobacterium tuberculosis* nucleoside-diphosphate kinase. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 50142-50149, 2004.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HOM, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350, 1985.

SAKATA, H.; HAYASHI, T.; HIRANO, Y.; MARUYAMA, S.; NARITA, M. [Brain stem encephalitis due to *Mycoplasma genitalium*]. **Kansenshogaku Zasshi**, v.67, p. 500-504, 1993.

SALMAN, M.; BOROVSKY, Z.; ROTTEM, S. *Mycoplasma penetrans* infection of Molt-3 lymphocytes induces changes in the lipid composition of host cells. **Microbiology**, v. 144, p. 3447-3454, 1998.

SASAKI, T.; SHINTANI, M.; KIHARA, K. Inhibition of growth of mammalian cell cultures by extracts of arginine - utilizing mycoplasma. **In Vitro**, v. 20, p. 369-375, 1984.

SAVIO, M. L.; CARUSO, A.; ALLEGRI, R.; FALLACARA, F.; POLLARA, C. P.; FORESTI, I.; COMBERTI, E.; GARGIULO, F.; DIMA, F.; CADEO, G. P.; TURANO, A. Detection of *Mycoplasma genitalium* from urethral swabs of human immunodeficiency virus-infected patients. **New Microbiol.**, v. 19, p. 203-209, 1996.

SCHULTZ, R. L.; KARLSSON, U. Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. II Effect of osmolarity, pH of perfusate and fixative concentration. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 12; p. 187-206, 1965.

SCIDMORE, M. A.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. **J. Cell. Biol.**, v. 134, p. 363-374, 1996.

SEMWOGERERE, D.; WEEKS, E. R. Confocal microscopy. **ENCYCLOPEDIA of Biomaterials and Biomedical Engineering**. [s.l.: S.n.], 2005. p. 1-10.

SETO, S.; LAYH-SCHMITT, G.; KENRI, T.; MIYATA, M. Visualization of the attachment organelle and cytodherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 1621-1630, 2001.

SHAMES, J. M.; GEORGE, R. B.; HOLLIDAY, W. B.; RASCH, J. R.; MOGABGAB, W. J. Comparasion of antibiotics in the treatment of mycoplasmal pneumonia. **Arch. Intern. Med.**, v. 125, p: 680-684, 1970.

SHAW, J. H.; FALKOW, S. 1988. Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1635-1632, 1988.

SHEPPARD, C. J. R.; SHOTTON, D. M. Image formation in the confocal laser scanning microscope. In: SHEPPARD, C. J. R.; SHOTTON, D.M. (Ed.). **Confocal Laser Scanning Microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1997a. p. 1-13.

SHEPPARD, C.J.R.; SHOTTON, D.M. Introduction. In: SHEPPARD, C. J. R.; SHOTTON, D.M. (Ed.). **Confocal Laser Scanning Microscopy**. New York: Springer-Verlag, p. 15-31, 1997b.

SHEPPARD, C.J.R.; SHOTTON, D.M. Confocal fluorescence measurements. In: SHEPPARD, C. J. R.; SHOTTON, D.M. (Ed.). **Confocal Laser Scanning Microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1997c. p. 61-70.

SHIBATA, K.; SASAKI, T.; WATANABE, T. AIDS-associated mycoplasma possess phospholipases C in the membrane. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 10, p. 4174-4177, 1995.

SIMMS, I.; EASTICK, K.; MALLINSON, H.; THOMAS, K.; GOKHALE, R.; HAY, P.; HERRING, A.; ROGERS, P. A. Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and pelvic inflammatory disease. **Sex. Transm. Infect.**, v. 79, p. 154-156, 2003.

SINHÁ, B.; FRANCOIS, P. P.; NUSSE, O.; FOTI, M.; HARTFORD, O. M.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T. J.; LEW, D. P.; HERRMAN, M.; KRAUSE, K. H.; Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. **Cell Microbiol.**, v. 1, p. 101-117, 1999.

SJÖSTRAND, F. S. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by electron microscopy. **J. Cell. Comp. Physiol.**, v. 42, p. 15-44, 1953.

SMITH, P.F. Quantitative measurement of the growth of Pleuropneumonia-like Organism. **Appl. Microbiol.**, v.4 , p. 254-259, 1956.

SMITH, P. F. **The biology of mycoplasmas**.In: SMITH, P. F (Ed). New York: Academic Press, 1971.

SMITH, P.K. **Measurement of protein using Bicinchoninic acid**. Rockford: Pierce Chemical Co, 1989. (Pierce Manual).

SMITH, A., MOWLES, J. Prevention and control of mycoplasma infection of cell cultures. In: TULLY, J. G., RAZIN, S. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 445-451.

SNELL, G.C. A comparison of alternative methods to viable count for indicating growth of *Mycoplasma gallisepticum* in liquid culture. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 50, p. 275-281, 1981.

STADTLANDER, C. T.; WATSON, H. L.; SIMECKA, J. W.; CASSEL, G. H. Cytopathogenicity of *Mycoplasma fermentans* (including strain incognitos). **Clin. Infect. Dis.**, v.17, p. 289-301, 1993.

STAHLBERG, A.; AMAN, P.; RIDELL, B.; MOSTAD, P.; KUBISTA, M. Quantitative real-time per method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of κ and λ immunoglobulin light chain expression. **Clin. Chem**, v. 49, p. 51-59, 2003.

STEIN, M. A.; BASEMAN, J. B. The evolving saga of *Mycoplasma genitalium*. **Clin. Microbiol. Newsl.**, v. 28, p. 41-48, 2006.

STELZER, E. H. The intermediate optical sytem of laser-scanning confocal microscopes. In: PAWLEY, J. B. (Ed.). **Handbook of biological Confocal Microscopy**. 2nd Ed. New York: Plenum Press, 1995. p. 327-346.

STEMKE, G.W.; ROBERTSON, J.A. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. **J. Clin. Microbiol.**, v.16, n. 5, p. 959-961, 1982.

STEWART, M.; BAKER, R. P.; BAYLISS, R.; CLAYTON, L.; GRANT, R. P.; LITTLEWOOD, T.; MATSUURA, Y. Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. **FEBS Lett.**, v. 498, p. 145-149, 2001.

SU, H.; McCLARTY, G.; DONG, F.; HATCH, G. M.; PAN, Z. K.; ZHONG, G. Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 9409-9416, 2004.

SVENSTRUP, H. F.; NIELSEN, P. K.; DRASBEK, M.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. 2002. Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 361, 2002.

SVENSTRUP, H. F.; FEDDER, J.; ABRAHAM-PESKIR, J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 18, n. 10, p. 2103-2109, 2003.

TAJIMA, M.; YAGIHASHI, T.; MIKI, Y. Capsular material of *Mycoplasma gallisepticum* and its possible relevance to the pathogenic process. **Infect. Immun.**, v. 36, p. 830-833, 1982.

TARSHIS, M.; SALMAN, M.; TOTTEM, S. Cholesterol is required for the fusion of single unilamellar vesicles with *Mycoplasma capricolum*. **Biophys. J.**, v. 64, p. 709-715, 1993.

TAYLOR-ROBINSON, D.; TULLY, J. G.; FURR, P. M.; COLE, R. M.; ROSE, D. L.; HANNA, N. F. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. **Isr. J. Med. Sci.**, v.17, p. 524-530, 1981

TAYLOR-ROBINSON, D.; BREDET, W. Motility of mycoplasma strain G37. **Yale J. Biol. Med.**, v.56, p. 910, 1983.

TAYLOR-ROBINSON, D.; DAVIES, H. A.; SARATHCHANDRA, P.; FURR, P. M. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 72, p. 705-714, 1991.

TAYLOR-ROBINSON D.; GILROY, C. B.; HAY, P. E. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in different populations and its clinical significance. **Clin. Infect. Dis.**, v.17, p. S66-8, 1993. Suppl 1.

TAYLOR-ROBINSON, D.; GILROY, C. B.; HOROWITZ, S.; HOROWITZ, J. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13, p. 1066-1069, 1994.

TAYLOR-ROBINSON, D. et al. Genital mycoplasmas. In: HOLMES, K. K. P. F.; SPARLING, P. A.; MARDH, S. M.; LEMON, W. E.; STAMM, P. P.; WASSERHEIT, J. N. (Ed.). **Sexually Transmitted Disease**. 3rd ed. New York : McGraw Hill, 1999. p. 533-548.

TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P. M. Observations on the antibiotic treatment of experimentally induced mycoplasmal infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, p. 622-630, 2000.

TAYLOR-ROBINSON, D.; HORNER, P. The role of *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis. **Sex. Trans. Infect.**, v. 77, p. 229-231, 2001.

TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma genitalium* -- an up-date. **Int. J. STD AIDS**, v. 13, p: 145-151, 2002.

TAYLOR-ROBINSON, D.; GILROY, C. B.; THOMAS, B. J.; HAY, P. E. *Mycoplasma genitalium* in chronic non-gonococcal urethritis. **Int. J. of STD AIDS**, v. 1, p: 21, 2004

THOMAS, A.; SACHSE, K.; FARNIR, F.; DIZIER, I.; MAINIL, J.; LINDEN, A. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 34, p. 141, 2003.

THORNS, C. J.; BOUGHTON, E. Effect of serial passages through liquid medium on the virulence of *Mycoplasma bovis* for the mouse mammary gland. **Res. Vet. Sci.**, v. 29, p. 328-332, 1980.

TIMENETSKY, J.; SANTOS, L. M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 907-914, 2006.

TOSH, A. K.; VanDerPoL, B.; FORTENBERRY, J. D.; WILLIAMS, J. A.; KATZ, B. P.; BATTEIGER, B. E.; ORR, D. P. *Mycoplasma genitalium* among adolescent women and their partners. **J. Adolesc. Health**, v. 40, p. 412-417, 2007.

TRANVAN NHIEU, G.; BOURDET-SICARD, R.; DUMENIL, G.; BLOCKER, A.; SANSONETTI, P. J. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 2, p. 187-193, 2000.

TSAI, S.; WEAR, D. J.; SHIH, J. W.; LO, S. C. Mycoplasmas and oncogenesis persistent infection and multistage malignant transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 10197-10201, 1995.

TU, A.; CLAPPER, B.; SHOEB, T. R.; ELGAVISH, A.; ZHANG, J.; LIU, L.; YU, H.; DYBVIG, K. Association of a major protein antigen of *Mycoplasma arthritidis* with virulence. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 245-249, 2005.

TULLY, J.G.; TAYLOR-ROBINSON, D.; COLE, R. M.; ROSE, D. L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet**, v. 1, p. 1288-1291, 1981.

TULLY, J. G.; TAYLOR-ROBINSON, D. ROSE, D. L.; COLE, R. M. BOVÉ, J. M. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 33, p. 387-396, 1983.

TULLY, J.G.; ROSE, D. L.; BASEMAN, J. B.; DALLO, S. F.; LAZZELL, A. L.; DAVIS, C. P. *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* mixture in synovial fluid isolate. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1851-1855, 1995.

TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: TULLY, J.G.; RAZIN, S. (Ed). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press Inc., 1995. p.33-40.

UNO, M.; DEGUCHI, T.; KOMEDA, H.; YASUDA, M.; TAMAKI, M.; MAEDA, S.; SAITO, I.; KAWADA, Y. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in men with gonococcal urethritis. **Int. J. STD AIDS**, v. 7, p. 443-444, 1996.

UPHOFF, C. C.; BRAUER, S.; GRUNICKE, D.; GIGNAC, S. M.; MACLEOD, R. A.; QUENTMEIER, H.; STEUBE, K.; TÜMMLER, M.; VOGES, M., WAGNER, B. et al. Sensivity and specificity of five different mycoplasma detection assay. **Leukemia**, v. 6, p. 335-341, 1992.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 38, p. 79-85, 2002.

vanOOIJ, C.; APODACA, G.; ENGEL, J. Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 758-766, 1997.

VANCINI, R. G.; BENCHIMOL, M. Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. **Arch Microbiol.** v. 189, n. 1, p. 7-18, 2008.

VILEI, E. M.; FREY, J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 85-92, 2001.

WAITES, K. B.; RUDD, P. T.; CROUSE, D. T.; CANUPP, K. C.; NELSON, K. G.; RAMSEY, C.; CASSEL, G. H. Chronic Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections of central nervous system in preterm infants. **Lancet**, v.1, p.17:21, 1988.

WAITES, K. B.; KAYZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 4, p. 757-789, 2005a.

WAITES, K.; TALKINGTON, D. New developments in human diseases due to mycoplasmas. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. (Ed.). **Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control**. Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience, 2005b. p. 289-355

WADHER, B. J.; HENDERSON, C. L.; MILES, R. J.; VARSANI, H. A mutant of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* lacking the H₂O₂ - producing enzyme L – a - glycerophosphate oxidase. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 72, p. 127-130, 1990.

WATARAI, M.; FUNATO, S.; SASAKAWA, C. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha 5\beta 1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. **J. Exp. Med.**, v.183, p. 991-999, 1996.

WATSON, B.W.; GAUCI, C.L.; BLACHE, L. A simple turbidity cell for continuously monitoring the growth of bacteria. **Phys. Med. Biol.**, v. 14, p. 555-558, 1969.

WEINER, J., 3rd; ZIMMERMAN, C. U.; GOHLMANN, H. W.; HERRMANN, R. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. **Nucleic Acids Res.**, v.31, p. 6306-6320, 2003.

WEISBURG, W.G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.; LAWRENCE, T. G.; VAN ETEN, J. et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 6455-6467, 1989.

WIKIPEDIA. The free encyclopedia, 2004. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Mycoplasma_genitalium.gif>. Acesso em: 16 maio 2007.

WILLIAMS, P. P.; GALLAGHER, J. E. Cytopathogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblasts. **Infect. Immun.**, v. 20, p. 495-502, 1978.

WILSON, T.; CARLI, A. R. Three dimensional imaging in confocal imaging systems with finite-sized detectors. **J. Microsc.**, v. 141, p. 51-66, 1988.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4238-4244, 2000.

WOLF, J. P.; MARCUS, L. Rapid determination by light scattering of growth parameters of *Mycoplasma laidlawii* in liquid media. **Appl. Microbiol.**, v.18, p. 4-7, 1969.

WOOD, R. L.; LUFT, J. H. The influence of buffer systems on fixation with osmium tetroxide. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 12, p. 22, 1965.

YAVLOVICH, A.; HIGAZI, A. A.-R.; ROTTEM, S. Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 4, p. 1977-1982, 2001.

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

YAVLOVICH, A.; KATZENELL, A.; TARSHIS, M.; HIGAZI, A. A.-R.; ROTTEM, S. *Mycoplasma fermentans* binds to and invades HeLa cells: involvement of plasminogen and urokinase. **Infect. Immun.**, v.72, n. 9, p. 5004-5011, 2004b.

YAVLOVICH, A.; ROTTEM, S. Binding of host extracellular matrix proteins to *Mycoplasma fermentans* and its effect on adherence to, and invasion of HeLa cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 266, p. 158-162, 2007.

YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R.; WATSON-McKOWN, R.; WISE, K. S. Molecular basis of mycoplasma surface antigen variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. **EMBO J.**, v. 10, p. 4069-4079, 1991.

YOSHIDA, T.; DEGUSHI, T.; ITO, M.; MAEDA, S.; TAMAKI, M.; ISHIKO, H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1451-1455, 2002.

ZHONG, G.; FAN, P.; JI, H.; DONG, F.; HUANG, Y. Identification of a chlamydial protease - like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 935-942, 2001.

ZURAWSKI, D. V.; MITSUHATA, C.; MUMY, K. L.; McCORMICK, B. A.; MAURELLI, A. T. OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 5964-5976, 2006.