

ALINE TEIXEIRA AMORIM

Participação de *Mollicutes* na modulação de linhagens celulares que expressam oncogenes de HPV 16 e HPV 18

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo
2020

ALINE TEIXEIRA AMORIM

Participação de *Mollicutes* na modulação de linhagens celulares que expressam oncogenes de HPV 16 e HPV 18

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Coorientadores:

Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Versão corrigida

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Amorim, Aline Teixeira

Participação de Mollicutes na modulação de
linhagens celulares que expressam oncogenes de HPV
16 e HPV 18 / Aline Teixeira Amorim; orientador
Jorge Timenetsky; coorientador Enrique Mario
Boccardo Pierulivo. -- São Paulo, 2020.

157 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mollicutes. 2. HPV. 3. Inflamação. 4. Ciclo
celular. 5. Dano ao DNA. I. Timenetsky, Jorge,
orientador. II. Boccardo Pierulivo, Enrique Mario ,
coorientador. III. Título.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Teixeira Amorim

Título da Tese: Participação de *Mollicutes* na modulação de linhagens celulares que expressam oncogenes de HPV 16 e 18

Orientador(a): Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Duzentos e São Paulo, SP - Av. Professor Lincoln Prestes, 34-15 - ICB 05 - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7723 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 783/2015 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação dos fatores de virulência de Mollicutes como cofatores para o câncer cervical*" sob a responsabilidade de Aline Teixeira Amorim e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Jorge Timenetsky**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPSH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 25 de novembro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 03/12/2015
REL. N.º 2746

Dedico este trabalho à minha filha, Alice, por dar sentido, brilho e felicidade à minha vida, por ser tão maravilhosa até nos momentos mais difíceis para a finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Isa e Dasio, por todos os ensinamentos e dedicação prestados a mim ao longo de tantos anos e por alcançarem comigo mais um sonho. Ao meu irmão, Alan, por estar sempre ao meu lado, mesmo que à distância, torcendo por minha felicidade.

Ao meu esposo, Antonio Carlos R. Braga Junior, por todo amor, carinho e cuidado demonstrados ao longo de todos esses anos, e por ser um exemplo de pai e companheiro. Essa conquista é nossa!

A todos os amigos e amigas que fizeram parte de toda essa trajetória, de forma direta ou indireta.

Sou grata a todos vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro, sem o qual este estudo não seria realizado.

Este trabalho foi financiado pelo projeto FAPESP 2014/05071-6

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

Agradecimento

Agradeço aos meus pais, Isa e Dasio, ao meu irmão Alan por serem a base pela qual formei o meu caráter, dignidade e força de vontade para correr atrás dos meus sonhos.

À dona do meu coração, Alice, minha filha, por ter me agraciado com sua presença ainda no doutorado, ser minha companheira na execução dos experimentos e estar ao meu lado na escrita desse trabalho. Com cada sorriso me fortaleceu para seguir em frente quando tudo parecia não funcionar. Te amo, meu passarinho!

Ao meu esposo, amigo e companheiro, Braga Junior, por toda a dedicação, palavras de fortalecimento, por todo amor e renúncia oferecidos durante esses anos de distância, e por toda a ajuda oferecidos ao longo da nossa jornada e principalmente nessa reta final do doutorado. Obrigada, meu amor!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timenetsky, pela oportunidade de desenvolver este trabalho de forma leve e ser um exemplo de ser humano e pesquisador. Obrigada por todas as orientações, sejam elas acadêmicas ou para a vida. Obrigada pela paciência e compreensão! Minha eterna gratidão!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, pelo grande profissional que você é, por ser meu eterno mestre e amigo. Obrigada por ter me mostrado o mundo científico, o qual desenvolvi profundo fascínio. Obrigada por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidei. Você é um agente transformador de realidades e é um exemplo para todos nós!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Enrique Boccardo, por ter aberto as portas do Laboratório de Oncovirologia, por todas as técnicas ensinadas, pelas orientações e ensinamentos durante as reuniões científicas e por confiar em mim e no meu trabalho. Por demonstrar a importância de um trabalho criterioso. Meu mais profundo agradecimento!

À Aricelma França, nossa “Celmãe”, por tantos ensinamentos, carinho, ombro amigo nos momentos de dificuldade. Mesmo à distância você nos ofereceu com muito carinho o seu tempo para os desabafos, nos revigorando para seguir em frente.

À outra família que conquistei com os membros do laboratório de Micoplasmas, Lucas, Guilherme, Aricelma, Maysa, Izadora, Camila, Verena, Ana Márcia, Regis, Prof. Jorge, Natália e Tadeu. Agradeço toda ajuda nos experimentos, organização da bancada, desde o preparo dos reagentes

até organização do laboratório. A todas as comemorações e encontros dentro e fora do Laboratório. Muito obrigada por toda ajuda e pelas “resenhas” do dia-a-dia.

Aos moradores atuais ou que passaram pelo nosso apartamento, ou “Nosso aconchego”, Maysa, Izadora, Abraão, Verena, Tássia, Gisela e Laila. Agradeço muito por compartilhar tantas experiências, seja de laboratório, de vida ou culinária. Obrigada por toda compreensão e ajuda, mesmo nos momentos mais difíceis, e por aguentarem o pior e o melhor de mim.

Agradeço às amigas Maysa, Camila e Cristina por compartilharem tantos momentos dentro e fora do laboratório, conselhos, ombro amigo e tantas alegrias. Obrigada por tudo!

Aos colegas e amigos formados no laboratório de Oncovirologia, Vanesca, Suellen, Telma, Bruna, José, Andressa, Anna, Filipe, Lina e Prof. Enrique. Obrigada por toda ajuda nos experimentos com culturas celulares e análises de proteínas, os conhecimentos trocados durante as reuniões científicas e pelos sorrisos e cafés compartilhados. Agradeço especialmente à Vanesca e a Suellen, pois além de toda ajuda e troca de experiências, se tornaram grandes amigas.

Aos amigos do laboratório LAPAM, Camila, Cristina, Felipe, Taiana, Giovanni, Alexandre, Naila, Kerstin, Renata e Mara por toda ajuda nos experimentos, pelo ombro amigo nos momentos de dificuldade e por todos os momentos felizes dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, em especial Lenon, Mariângela, Patrícia, Samuel, Rubens, Karine, Natyele, Jamile, Alexia, Tácita e Robert, por todo o acolhimento e alegrias, e por levarem um pouco da energia da Bahia para as terras paulistanas.

Ao amigo Davi Martins, do Laboratório de Reparo de DNA, ICB/USP, por contribuir na condução dos experimentos relacionados à citometria de fluxo.

Ao amigo Ricardo Cesar Cintra, do Laboratório de Inovação em Câncer - Centro de Medicina Nuclear, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, por toda a amizade e por contribuir na execução dos experimentos relacionados à análise da expressão das oncoproteínas do HPV.

Ao meu esposo, Prof. Dr. Antônio Carlos Braga Jr. do IMS/CAT UFBA por toda ajuda e apoio nas análises estatísticas ao longo deste trabalho.

Aos professores Prof. Dr. Benedito Correia, Profa. Dra. Marilis Marques, Profa. Dra. Marcia Mayer e ao Aurélio do CEFAP por terem cedido a utilização dos equipamentos para execução dos ensaios de qPCR.

Aos professores Profa. Dra. Marílis do Valle Marques, Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez e a Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva, Prof. Dr. Carlos Menck pela orientação durante o estágio PAE e aos amigos conquistados durante a realização do estágio, Davi, Camila, Felipe e Sofia. Obrigada por todo conhecimento e alegrias compartilhados!

Ao projeto Biocientista Mirim, por ter aberto a oportunidade para os pós-graduandos participarem de um projeto de extensão tão enriquecedor, e demonstrado que a universidade deve-se fazer também além dos muros da instituição.

Gratidão à Comissão de Apoio à Comunidade (CAC) do ICB/USP por todo suporte prestado nos momentos de dificuldade, em especial à Telma Monezi, Leila Affini e a Nancy Rebouças por todo acolhimento e orientações.

Aos amigos de outros laboratórios do departamento de Microbiologia e de todo o ICB: Maysa, Camila, Cristina, Vanesca, Suellen, Caio, Márcia, Brenda, Quésia, Fernanda, Marcelo, Marina, Cecília, Rafael, Leandro, Kleyson, Lucas, Ágata, Camila, Daniela, Elisabeth.

A todos os docentes da USP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários Gisele, Renato, Naíde, Vânia e Isabel das secretarias do Departamento de Microbiologia pela atenção, paciência e por serem tão prestativos ao longo destes anos.

Aos funcionários da limpeza, manutenção, segurança, portaria e dos restaurantes universitários ("bandejões") por serem tão gentis, zelando do nosso bem estar e segurança.

Ao Laboratório de Microbiologia do IMS/CAT UFBA pelo apoio ao longo de todos esses anos. Em especial, ao Prof. Dr. Lucas por abrir as portas do laboratório para a realização dos experimentos e às alunas Karol, Clarissa e Caline por toda ajuda prestada na execução dos experimentos.

Aos amigos de longa data e aos recentes (Lucas, Guilherme, Regiane, Verena, Danilo, Daniel, Priscila, Mara, Débora, Ana Míria, Vanessa, Thomas, Angélica, Daniela e Camila) por serem tão marcantes na minha caminhada até aqui e por se fazerem presentes mesmo à distância oferecendo sempre carinho e palavras de conforto.

Ao grupo Cirandeiros, em especial à Kika e Marcela, por todo suporte prestado na minha gestação e por contribuir na construção da minha melhor versão: uma mãe cientista.

Aos primos Claudinho, Mauren, Cristina, Bruno, Rose e Thiago e às “crianças” por todo acolhimento e ajuda prestados no processo de mudança e durante a minha estadia e visitas à São Paulo.

À família mais amada desse mundo, a família Amorim, por ser fonte de inspiração de união, amor e amizade e por compreender a minha ausência ao longo desses anos. Sou grata a todos vocês! Também agradeço à toda família Muniz, principalmente à minha sogra Rosa, por todo carinho, amizade e cuidado.

Aos demais amigos e familiares não citados e que desejaram toda força e sucesso. Muito obrigado!

A Deus e a todos os espíritos de luz que me guiam durante a minha caminhada.

A todos, aqui não mencionados, que de alguma forma viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os cientistas brasileiros, principalmente às mulheres cientistas, que mesmo diante de tantas dificuldades e falta de incentivos lutam para o avanço científico. Meus parabéns a todos e todas vocês e obrigada por serem tão inspiradores!

Agradecimento especial a todo o povo brasileiro, pois reconheço que nem todos têm acesso à educação. Com a contribuição oferecida por meio dos impostos, foi dada a oportunidade para a minha capacitação numa instituição pública de qualidade. Reforçarei o meu compromisso em dar um retorno da forma mais produtiva possível, pois acredito fortemente na frase do ilustríssimo Paulo Freire: *“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”*.

“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha juntos é o começo da realidade.”

Miguel de Cervantes Saavedra

“A ciência é um jeito de não enganarmos a nós mesmos. E aos outros... Se os cientistas pecam? Claro! Já usamos mal a Ciência, assim como qualquer outra ferramenta à nossa disposição, e é por isso que não podemos deixá-la nas mãos de poucos poderosos. Quanto mais a Ciência pertencer a todos nós, menor a probabilidade de ser mal utilizada. (...)

Descobrir a idade da terra, ou a distância das estrelas, ou como a vida realmente evoluiu... Que diferença isso faz? Depende do tamanho do Universo que você quer viver. Tem quem goste dele pequeno... tudo bem! É compreensível! Mas eu gosto dele grande e, quando analiso ele com o coração e a mente meu espírito se eleva e, quando tenho esse sentimento, quero que ele seja de verdade, e não que seja algo que está acontecendo apenas dentro da minha cabeça. É importante saber se é real. E nossa imaginação não é nada diante da incrível capacidade da natureza.”

Neil Degresse Tysson

(Cosmos, temporada 1, episódio 13)

RESUMO

AMORIM, A. T. **PARTICIPAÇÃO DE *MOLLICUTES* NA MODULAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES QUE EXPRESSAM ONCOGENES DE HPV 16 E HPV 18.** 2020. 157 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020

O câncer cervical necessita da infecção prévia por um agente sexualmente transmissível, o Papilomavírus Humano (HPV). Entretanto, somente a infecção viral não é suficiente para o desenvolvimento das neoplasias. As atividades pró-inflamatórias causadas pelas infecções por outros micro-organismos têm sido apontadas como cofatores neste contexto. O objetivo deste estudo foi verificar a associação da infecção por *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* com modulações na proliferação, viabilidade e resposta inflamatória de células SiHa, HeLa e PHK. Padronizou-se o inóculo (Unidades Formadoras de Colônia-UFC) dos micro-organismos para as infecções celulares, realizou-se curvas de crescimento e ensaio clonogênico para as quatro espécies bacterianas. *M. hominis* causou maior interferência na proliferação das células. Assim, este estudo priorizou esta espécie para os ensaios posteriores. Foi verificada morte celular pelo aumento da população celular na fase Sub-G0/G1 do ciclo celular logo após 6 horas de infecção para as três linhagens celulares, mas em 48 horas de infecção apenas para PHK e HeLa. Em relação às fases G1, S e G2 entre as células SiHa, não houve praticamente interferência durante a infecção. Contudo, a célula HeLa apresentou diminuição da população celular nas fases G1 e G2 e aumento do número de células na fase S após 48 horas de infecção. As células PHK apresentaram alterações nas fases do ciclo após 6 e 48 h de infecção, principalmente entre as fases S e G2. Foram observadas alterações na expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas em SiHa, HeLa e PHK. Incluem-se alterações na expressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 em SiHa e HeLa, respectivamente. Detectou-se também com *M. hominis* a modulação da expressão de genes relacionados à via de Toll-like, bem como às vias de dano ao DNA nas três linhagens celulares e alterações na liberação de citocinas, como IL1-B, IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF. Desta maneira conclui-se que *M. hominis* possui a capacidade de causar danos à célula, bem como alterar a modulação celular em resposta à infecção. Estes resultados contribuem para o melhor entendimento do papel dos *Mollicutes* nas infecções e as consequências da sua participação junto com o HPV no desenvolvimento das lesões cervicais.

PALAVRAS-CHAVE: *Mollicutes*. HPV. Toll-like. Ciclo celular. Apoptose. Dano ao DNA.

ABSTRACT

AMORIM, A. T. **PARTICIPATION OF *MOLLICUTES* IN THE MODULATION OF CELLULAR LINES EXPRESSING HPV 16 AND HPV 18 ONCOGENES.** 2020. 157 p. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cervical cancer requires a previous infection by Human Papillomavirus (HPV). However, virus infection is not sufficient for the development of neoplasms, and it is necessary the cofactors establishment that favor a continuous inflammatory response for the progression of lesions, such as infection by other microorganisms. The purpose of this study was to verify the association of infection by *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* and *U. parvum* with modulations in the proliferation, viability and inflammatory response of SiHa, HeLa and PHK cells. After standardizing the quantification of *Mollicutes* through the establishment of Colony Forming Units (CFU), the amount of microorganisms to be used in cell infections was defined. Growth curves and clonogenic assays were performed for the four bacteria. *M. hominis* showed a more prominent effect on the proliferation of SiHa, HeLa and PHK. Due to this fact, all subsequent tests were performed using this specie. Cell death was observed by increase of Sub-G0/G1 population just after 6 hours of infection for the three cell lines, but only for PHK and HeLa after 48 hours of infection. Regarding phases G1, S and G2 between SiHa cells, no substantial effects were observed between cells infected at different times. However, HeLa infected with *M. hominis*, showed a decrease in the cell population in phases G1 and G2 and an increase in the number of cells in phase S after 48 hours of infection. PHK infected by *M. hominis* showed changes in the cycle phases both after 6 and 48 h of infection, mainly between phases S and G2. We found that *M. hominis* infection led to changes in the amount of both pro and anti-apoptotic proteins in SiHa, HeLa and PHK. Changes in the expression of the oncogenes E6 and E7 of HPV 16 and HPV 18 were verified in both SiHa and HeLa, respectively. A significant role was observed in the modulation of the expression of genes related to the Toll-like pathway, as well as to the DNA damage pathways in the three cell lines studied. Infection by the microorganism also led to changes in the release of cytokines, such as IL-1- β , IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- γ and GM-CSF. Through these data, we can see that *M. hominis* has the ability to cause damage to the cell, as well as alter cell modulation in response to infection. These results may contribute to a better understanding of the role of *Mollicutes* in infections and their participation close to HPV in the development of cervical lesions

KEYWORDS: *Mollicutes*. HPV. Toll-like. Cell cycle. Apoptosis. DNA damage.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% –	Por cento
ASCUS –	Células escamosas atípicas de significado desconhecido
atm –	Atmosfera
ATP –	Adenosina trifosfato
CCU –	<i>Color Change Unit</i> (Unidade de Mudança Colorimétrica)
CST –	<i>Community State Types</i> (tipos diferentes de microbioma vaginal)
cDNA –	DNA complementar
CO ₂ –	Dióxido de carbono
Ct –	<i>Cycle Treshold</i> (Sinal de fluorescência que pode ser detectado)
D10 –	DMEM suplementado com 10% de SFB
DAMPs –	Padrões moleculares associados à danos
DIP –	Doença Inflamatória Pélvica
DMEM -	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
dNTP –	Deoxinucleotídeo trifosfato
DT –	<i>Doubling time</i> , ou tempo de dobramento, ou tempo de duplicação
E1 – E7 –	Proteínas precoces de HPV (E= <i>early</i>)
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g –	Força g
G1 –	Gap 1
G2 –	Gap 2
GAPDH –	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC –	Guanina e citosina
GM-CSF –	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HPV –	Vírus do Papiloma Humano
hTERT –	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i> (Subunidade catalítica da telomerase)
IARC –	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IFN- α –	Interferons α
IFN- β –	Interferons β
IFN- γ –	Interferon gama
IS –	Sequências de inserção

IST –	Infecção Sexualmente Transmissível
<i>KBM</i> –	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
Kpb –	Quilo pares de base
L1 e L2 –	Proteínas tardias 1 e 2 do HPV (L= <i>late</i>)
LAMPs –	Proteínas associadas a membranas
LCR –	<i>Long control region</i>
M –	Mitose
Mb –	Mega pares de base
MBA –	<i>multiple-banded antigen</i>
MgCl ₂ –	Cloreto de Magnésio
MHC –	Complexo de histocompatibilidade
mL –	Mililitro
mM –	Milimolar
Mn ²⁺ –	Manganês
<i>MOI</i> –	Multiplicidade de infecção
NADH -	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ng –	Nanograma
NH ₃ –	Amônia
nm –	Nanômetro
nM –	Nanomolar
°C –	Graus Celsius
OMS (WHO) –	Organização Mundial de Saúde
ORF –	Open Read Frame
PAMPs –	Padrões moleculares associados a patógenos (
Pb –	Pares de base
PBS –	Tampão fosfato-salino
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
pH –	Potencial hidrogeniônico
PHK –	<i>Primary Human Keratinocytes</i> (queratinócitos primários humanos)
PI –	Iodeto de propídio
pRb –	Proteína do retinoblastoma
PRRs –	Receptores de reconhecimento de padrões

qPCR –	Reação da cadeia da polimerase quantitativa (PCR em tempo real)
RNA –	Ácido desoxirribonucleico
Rpm –	Rotações por minuto
RT-qPCR –	Reação da transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR em tempo real)
S –	Síntese do DNA
TGF- β –	Fator de crescimento β
TLR –	Toll-like receptor
TNF- α –	Fator de necrose tumoral α
U –	Unidade
UFC –	Unidade Formadora de Colônia (UFC)
UNG-NC –	Uretrite não gonocócica e não clamidial
VB –	Vaginose Bacteriana
μ L –	Microlitro
μ m –	Micrometros
μ M –	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do genoma do HPV.....	26
Figura 2 – Estágios do ciclo viral do Papilomavírus Humano em epitélio estratificado escamoso e na zona de transformação ou junção escamocolunar (JEC). Expressão das proteínas precoces (E) e tardias (L).....	28
Figura 3 – Papel da microbiota e de patógenos responsáveis por disbioses no processo de desenvolvimento do câncer cervical.	33
Figura 4 – Morfologia celular diversa no gênero <i>Mycoplasma</i>	36
Figura 5 – Célula de <i>M. genitalium</i> (G-37).	39
Figura 6 – Características de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i>	40
Figura 7 – Morfologia celular de ureaplasma.	43
Figura 8 – Alteração de coloração dos meios de cultura devido à mudança do pH após crescimento dos micro-organismos.....	48
Figura 9 – Histogramas obtidos a partir dos dados de citometria de fluxo para análise das células em fase Sub-G0/G1 do ciclo celular.	53
Figura 10 – Histogramas obtidos a partir dos dados de citometria de fluxo para análise das células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular.	54
Figura 11 – Representação das revelações das membranas de nitrocelulose do kit Human Apoptosis Array (Proteome Profiler, R&D Systems, Minneapolis, USA).	56
Figura 12 – Representação da integridade do RNA após extração.	59
Figura 13 – Representação da integridade do RNA de células HeLa após extração.....	59
Figura 14 – Quantificação de <i>Mollicutes</i> por CCU.	67
Figura 15 – Visualização de colônias de mollicutes por microscopia óptica.	68
Figura 16 – Visualização de colônias de <i>U. parvum</i> por meio de microscópio estereoscópico (lupa).	69
Figura 17 - Quantidade de células SiHa viáveis após 72h de infecção com diferentes concentrações de espécies de <i>Mollicutes</i>	71
Figura 18 – Quantidade de células HeLa viáveis após 72h de infecção com diferentes concentrações de espécies de <i>Mollicutes</i>	72
Figura 19 – Quantidade de células PHK viáveis após 72h de infecção com diferentes concentrações de espécies de <i>Mollicutes</i>	73

Figura 20 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>M. hominis</i> .	76
Figura 21 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>M. hominis</i> .	77
Figura 22 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 116 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>M. hominis</i> .	78
Figura 23 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 116 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>M. hominis</i> .	79
Figura 24 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>M. genitalium</i> .	81
Figura 25 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>M. genitalium</i> .	82
Figura 26 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>M. genitalium</i> .	83
Figura 27 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>M. genitalium</i> .	84
Figura 28 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>U. urealyticum</i> .	85
Figura 29 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>U. urealyticum</i> .	86
Figura 30 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>U. urealyticum</i> .	87
Figura 31 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>U. urealyticum</i> .	88
Figura 32 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>U. parvum</i> .	90
Figura 33 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por <i>U. parvum</i> .	91
Figura 34 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>U. parvum</i> .	92
Figura 35 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por <i>U. parvum</i> .	93
Figura 36 – Ensaio clonogênico realizado com células SiHa, HeLa e PHK após infecção por <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i> .	95
Figura 37 – Análise das células SiHa, HeLa e PHK presentes na fase Sub-G0/G1 do ciclo celular após infecção por <i>M. hominis</i> .	96

Figura 38 – Análise das células SiHa, HeLa e PHK presentes nas diferentes fases do ciclo celular após infecção por <i>M. hominis</i>	98
Figura 39 – Efeito da infecção por <i>M. hominis</i> na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose.	100
Figura 40 - Análise da expressão dos genes E6/E7 do HPV 16 e HPV 18 por RT-qPCR.	103
Figura 41 – Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias dos receptores do tipo Toll em células SiHa infectadas por <i>M. hominis</i>	104
Figura 42 – Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias dos receptores do tipo Toll em células HeLa infectadas por <i>M. hominis</i>	105
Figura 43 - Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias dos receptores do tipo Toll em células PHK infectadas por <i>M. hominis</i>	106
Figura 44 – Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias de danos ao DNA em células HeLa infectadas por <i>M. hominis</i> por 48 horas.	108
Figura 45 – Análise de expressão gênica dos genes relacionados às vias de danos ao DNA em células PHK infectadas por <i>M. hominis</i>	109
Figura 46 – Quantificação de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura de células SiHa após 48 horas de infecção por <i>M. hominis</i>	110
Figura 47 – Quantificação de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura de células HeLa após 48 horas de infecção por <i>M. hominis</i>	111
Figura 48 – Quantificação de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura de células PHK após 48 horas de infecção por <i>M. hominis</i>	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Lista de anticorpos primários presentes na membrana de nitrocelulose do kit Human Apoptosis Array (R&D Systems, Proteome Profiler™, Minneapolis, USA).	57
Quadro 2 – Relação dos primers utilizados para controle da transcrição reversa e para a análise de expressão dos genes E6 e E7 dos HPV 16 e HPV 18.	61
Quadro 3 – Relação dos genes quantificados pelo kit <i>Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway</i> PAHS-018ZA (Qiagen).	62
Quadro 4 – Relação dos genes quantificados pelo kit <i>Human DNA Damage Signaling Pathway</i> PAHS-029ZA (Qiagen).	64
Quadro 5 – Concentração de micro-organismos nas suspensões de estoque para infecções em SiHa, HeLa e PHK para o ensaio de dose infectante.	70
Quadro 6 – Relação das MOI utilizadas para as infecções das células SiHa, HeLa e PHK para realização das curvas de crescimento.	74
Quadro 7 – Doubling time (DT) das curvas de crescimento das células SiHa, HeLa, PHK, PHK pLXSN Ø e PHK pLXSN HPV 16 E6E7 infectadas com <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>	75
Quadro 8 – Efeito da infecção por <i>M. hominis</i> na expressão de proteínas envolvidas na regulação/ativação de apoptose em células SiHa, HeLa e PHK.....	101

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1	Características biológicas do HPV	25
2.2	O processo de infecção pelo HPV	26
2.3	O HPV e a evasão da resposta imune do hospedeiro	30
2.4	HPV, cofatores e o câncer cervical	31
2.5	Características gerais dos <i>Mollicutes</i>	34
2.5.1	<i>Mycoplasma genitalium</i>	38
2.5.2	<i>Mycoplasma hominis</i>	40
2.5.3	<i>Ureaplasma spp.</i>	42
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Crescimento dos micro-organismos utilizados	47
4.2	Preparação dos micro-organismos para contagem e infecção em células	48
4.3	Cultivo das linhagens celulares	49
4.4	Dose infectante e curva de crescimento	50
4.5	Ensaio clonogênico	51
4.6	Análise de conteúdo Sub-G0/G1 e do ciclo celular por citometria de fluxo	51
4.7	Obtenção de extratos proteicos	55
4.8	Análise dos níveis de proteínas envolvidas na regulação/ativação da apoptose	55
4.9	Quantificação das citocinas	57
4.10	Expressão gênica RT-qPCR	57
4.10.1	Cultura de Células	57
4.10.2	Extração de RNA e síntese de cDNA	58
4.10.3	Expressão de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 em células SiHa e HeLa	60
4.11.3.1	Desenho dos primers e padronização da reação	60
4.10.3.2	Seleção de genes normalizadores	61

4.10.3.3	Análise de Expressão Gênica	61
4.10.4	Análise de expressão gênica: <i>Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway</i> e <i>Human DNA Damage Signaling Pathway</i>	61
4.11	Análise estatística	66
5	RESULTADOS	67
5.1	Avaliação do crescimento dos micro-organismos	67
5.2	Dose infectante	70
5.3	Curvas de crescimento	73
5.4	Ensaio clonogênico	94
5.5	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	95
5.6	Quantificação de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose	99
5.7	Análise da expressão gênica por RT-qPCR	101
5.7.1	Análise da expressão dos genes E6 e E7 de HPV 16 (SiHa) e HPV 18 (HeLa)	102
5.7.2	Análise da expressão dos genes relacionados à via dos receptores do tipo Toll	103
5.7.3	Análise da expressão dos genes relacionados à via de dano ao DNA	107
5.8	Quantificação de citocinas produzidas pelas linhagens celulares	109
6	DISCUSSÃO	113
7	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o quarto câncer mais frequente em mulheres no mundo, classificando-se após o câncer de mama (2,1 milhões de casos), câncer colorretal (0,8 milhões) e câncer de pulmão (0,7 milhões). Aproximadamente 570.000 novos casos e 311.000 mortes pela doença ocorreram em 2018. A incidência padronizada por idade estimada foi de 13,1 por 100.000 mulheres em todo o mundo e variou amplamente entre os países, com taxas variando de menos de 2 a 75 por 100.000 mulheres (ARBYN; WEIDERPASS; BRUNI; DE SANJOSÉ *et al.*, 2020). Contudo, a incidência varia de acordo com a região, fator influenciado principalmente pelas características socioeconômicas. No Brasil, o câncer cervical é considerado o terceiro mais frequente (7,4%), ficando atrás apenas do câncer de mama (29,7)% e o câncer de colon e reto (9,2%), segundo a última estimativa publicada em 2018 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019). Ainda segundo o instituto, o número de casos novos da neoplasia esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 16.710, com um risco estimado de 16,35 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (22,47/100 mil), o segundo no Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil). Já na Região Sul (17,48/100 mil), ocupa a quarta posição e, na Região Sudeste (12,01/100 mil), a quinta posição (INCA, 2019). A infecção persistente por tipos de papilomavírus humano carcinogênico (HPV), por exemplo HPV-16 e HPV-18, é a principal causa para o desenvolvimento de câncer do colo do útero. A presença do vírus é um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical devido a diversas peculiaridades relacionadas ao processo infeccioso estabelecido (CLIFFORD; SMITH; AGUADO; FRANCESCHI, 2003; LUKIC; CANZIO; PATELLA; GIOVAGNOLI *et al.*, 2006; SCHIFFMAN; CLIFFORD; BUONAGURO, 2009; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; ZUR HAUSEN, 2009).

Esses vírus produzem oncoproteínas que interagem com a maquinaria celular causando alterações que imortalizam e transformam células infectadas. As proteínas E6 e E7 são as principais proteínas transformantes dos HPVs de alto risco, atuando, principalmente, sobre proteínas que regulam o ciclo celular (MCMURRAY; NGUYEN; WESTBROOK; MCANCE, 2001). Os vírus HPV também possuem mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007). A carcinogênese na região cervical depende da história natural da infecção pelo HPV, que inclui a infecção inicial por HPV, a persistência da infecção com expressão dos oncogenes virais, progressão de lesões pré-cancerosas e, eventualmente, invasão no tecido (SCHIFFMAN; WENTZENSEN; WACHOLDER; KINNEY *et al.*, 2011). Adicionalmente, a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro bem como a carga viral têm sido descritos

como fatores inerentes aos vírus importantes na carcinogênese (IARC, 2007). O desenvolvimento do câncer cervical pelo HPV de alto risco oncogênico possui papel central na etiologia de praticamente todos os casos de câncer do colo do útero, com exceção de casos raros negativos para o HPV. Assim, este vírus é corretamente chamado de causa necessária, mas não suficiente do câncer do colo do útero. Isso porque a infecção sexualmente transmissível causada pelo HPV é considerado uma das mais comuns. A grande maioria das mulheres e homens sexualmente ativos foi infectada pelo HPV pelo menos uma vez na vida, mas a infecção geralmente desaparece espontaneamente alguns meses após a aquisição, com cerca de 90% de desaparecimento em 2 anos (BOSCH; DE SANJOSÉ, 2007; BOSCH; LORINCZ; MUÑOZ; MEIJER *et al.*, 2002; BRUNI; ALBERO; SERRANO; MENA *et al.*, 2019; BURD, 2003; SCHIFFMAN; WENTZENSEN; WACHOLDER; KINNEY *et al.*, 2011). Apenas um pequeno número de mulheres infectadas por HPV progride para câncer cervical invasivo (CCI), sendo que essa proporção é variável de acordo entre as diferentes regiões do mundo e influenciada por diversos fatores, como pode ser observado pelo estudo por Bruni *et al.* (2019) (BRUNI; ALBERO; SERRANO; MENA *et al.*, 2019; HO; BIERMAN; BEARDSLEY; CHANG *et al.*, 1998; SUDENGA; SHRESTHA, 2013).

Desconhecem-se os fatores entre a depuração da infecção, a persistência do vírus e o desenvolvimento das neoplasias. Estudos apontam que o desenvolvimento da câncer cervical depende de cofatores que atuam com o HPV de alto risco oncogênico, como: resposta imunológica do indivíduo, características genéticas, tabagismo, hormônios, deficiências nutricionais, bem como a presença de outros micro-organismos na região genital (IARC, 2007; IARC-MONOGRAPHS, 2012; MUÑOZ; CASTELLSAGUÉ; DE GONZÁLEZ; GISSMANN, 2006; SMITH; MUÑOZ; HERRERO; ELUF-NETO *et al.*, 2002).

Nesse aspecto, estudos voltados à compreensão do microbioma vaginal têm sido amplamente difundidos no campo médico, e se fazem necessários para a compreensão da saúde sexual feminina (RAVEL; GAJER; ABDO; SCHNEIDER *et al.*, 2011; ROMERO; HASSAN; GAJER; TARCA *et al.*, 2014; SHIPITSYNA; ROOS; DATCU; HALLÉN *et al.*, 2013; ZHOU; BROTMAN; GAJER; ABDO *et al.*, 2010). Dentre os principais agentes etiológicos responsáveis pelas ISTs que podem estar potencialmente envolvidos na carcinogênese cervical, destacam-se: *Chlamydia trachomatis*, vírus do herpes simplex (HSV) 1 e 2, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* e espécies de *Mollicutes*, que causam processos inflamatórios podendo gerar microtraumas no epitélio cervical e promoverem a persistência da infecção pelo HPV (ADEBAMOWO; MA; ZELLA; FAMOOTU *et al.*, 2017; IARC, 2007; IARC-MONOGRAPHS, 2012; KLEIN; GONZALEZ; SAMWEL; KAHESA *et al.*, 2019; KLEIN; SAMWEL; KAHESA; MWAISELAGE *et al.*, 2020; LIN; KOUZY; ABI JAOUDE; NOTICEWALA *et al.*, 2020; QUAN; DONG; YANG; CHEN

et al., 2019; USYK; ZOLNIK; CASTLE; PORRAS *et al.*, 2020; WOHLMEISTER; VIANNA; HELFER; GIMENES *et al.*, 2016).

Espécies de *Mollicutes* têm sido descritas como principais causadores de diversos distúrbios genitais, tais como as uretrites não gonocócicas e não clamidiais (UNG-NC), em casos de vaginose bacteriana (VB), cervicite, salpingite, infertilidade e aborto. Tais microrganismos são capazes de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , e quimiocinas. O recrutamento de células da resposta imune para o local da infecção causa intensa inflamação. Esta resposta tem sido associada como um possível fator de risco para desenvolvimento de lesões pré-cancerosas (CASSELL; WAITES; WATSON; CROUSE *et al.*, 1993; EKIEL; FRIEDEK; ROMANIK; JÓŹWIAK *et al.*, 2009; GUIJON; PARASKEVAS; RAND; HEYWOOD *et al.*, 1992; HARADA; TANAKA; KOMORI; TSUJI *et al.*, 2008; MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009; REYES; REINHARD; O'DONELL; STEVENS *et al.*, 2006; TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011).

Pouco se sabe sobre quais mecanismos moleculares dos *Mollicutes* estariam associados para a progressão das lesões cervicais (BIERNAT-SUDOLSKA; SZOSTEK; ROJEK-ZAKRZEWSKA; KLIMEK *et al.*, 2011; BORNSTEIN; RAHAT; ABRAMOVICI, 1995; KLEIN; SAMWEL; KAHESA; MWAISELAGE *et al.*, 2020; LIN; KOUZY; ABI JAOUDE; NOTICEWALA *et al.*, 2020; LUKIC; CANZIO; PATELLA; GIOVAGNOLI *et al.*, 2006). Em um estudo publicado por nosso grupo foi demonstrada a associação entre a carga destes micro-organismos com as lesões cervicais de alto grau (AMORIM; MARQUES; CAMPOS; LOBÃO *et al.*, 2017). Outros estudos foram conduzidos com a finalidade de entender a participação de *Mollicutes* no desenvolvimento do câncer cervical, os quais foram analisados e reunidos recentemente numa revisão publicada por Ye *et al.* (2018) (YE; SONG; ZENG; LI *et al.*, 2018). A associação de fatores a uma doença quase sempre requer mais evidências, e o câncer cervical é um tema que necessita de maiores esclarecimentos quanto ao seu desenvolvimento. Dessa forma, avaliar o papel de espécies de *Mollicutes* na modulação de linhagens celulares normais, como os queratinócitos, e em linhagens que expressam oncoproteínas de HPV 16 e HPV 18, como SiHa e HeLa, poderá contribuir para o estabelecimento de mais um fator de risco para a ocorrência das transformações que originam as lesões cervicais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características biológicas do HPV

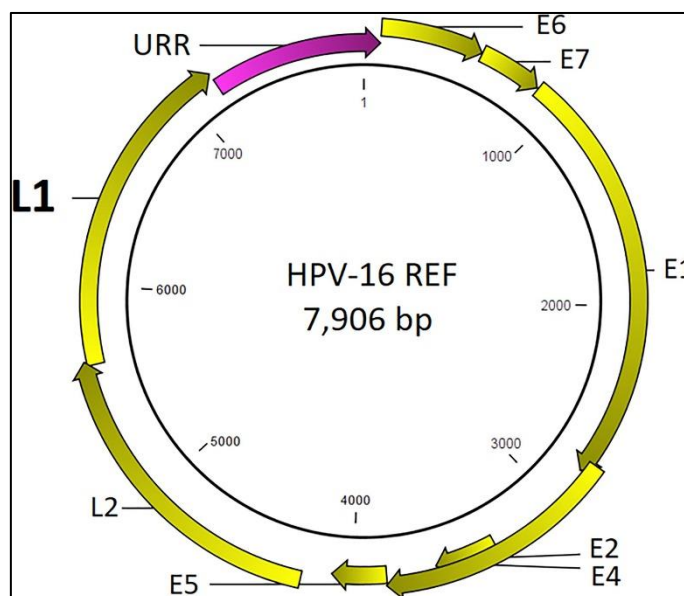
Os Vírus do Papiloma Humano (HPV) pertencem à família *Papillomaviridae* e infectam principalmente mucosa e epitélios queratinizados (VAN DOORSLAER; CHEN; BERNARD; CHAN *et al.*, 2018). A classificação taxonômica atual dos vírus do papiloma é baseada na sequência nucleotídica da ORF L1. Por essa classificação, a família *Papillomaviridae* se divide em duas subfamílias, *Firstpapillomavirinae* e *Secondpapillomavirinae*, pois seus membros compartilham entre si menos de 45% de similaridade de sequência. Atualmente, os gêneros de papilomavírus passam a ser delineados principalmente por inspeção de árvores filogenéticas derivadas de quatro sequências nucleotídicas concatenadas de E1, E2, L1 e L2. Sendo assim, a divisão em gêneros diferentes ainda é considerada quando há menos de 60% de similaridade das sequências nucleotídicas (VAN DOORSLAER; CHEN; BERNARD; CHAN *et al.*, 2018). Para definição de espécie dentro de um gênero, deve haver mais de 70% de similaridade das sequências de L1. Por fim, para definição de tipos, deve haver 90% de similaridade na sequência de L1 (BERNARD; BURK; CHEN; VAN DOORSLAER *et al.*, 2010; DE VILLIERS; FAUQUET; BROKER; BERNARD *et al.*, 2004). Atualmente são descritos 53 gêneros, 133 espécies e 343 isolados de Papilomavírus (VAN DOORSLAER; CHEN; BERNARD; CHAN *et al.*, 2018). Estudos em andamento buscam refinar o esquema de classificação do vírus do papiloma. Dentro da subfamília *Firstpapillomavirinae*, encontramos o gênero *Alphapapillomavirus*, o qual possui os principais membros que colonizam humanos, com 14 espécies até o momento (BERNARD, 2013; BERNARD; BURK; CHEN; VAN DOORSLAER *et al.*, 2010; DE VILLIERS; FAUQUET; BROKER; BERNARD *et al.*, 2004; VAN DOORSLAER; CHEN; BERNARD; CHAN *et al.*, 2018).

Os HPVs podem ser classificados como de baixo e alto risco oncogênico de acordo com sua capacidade de gerar neoplasias (CUBIE, 2013). Os de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) estão relacionados com o desenvolvimento de verrugas e lesões de baixo grau e possuem pouca ou nenhuma capacidade para desenvolver neoplasias. Os de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) são associados com lesões intraepiteliais de alto grau, carcinomas invasivos do colo uterino e alta relação com a ocorrência de carcinomas anais, de vulva, de pênis e de cabeça e pescoço. Quanto ao câncer cervical, HPV 16 e o 18 são os tipos mais encontrados (IARC, 2007).

São vírus pequenos de 52 - 55 nm de diâmetro e não envelopados, com genomas de DNA circular de fita dupla de 5.748 pb a 8.607 pb ligado a histonas celulares. O genoma é envolvido com as histonas H2a, H2b, H3 e H4 formando um complexo contido no capsídeo, que apresenta

simetria icosaédrica. Os genomas têm um conteúdo GC de 42% em média (36-59%). O capsídeo viral tem aproximadamente 600 Å de diâmetro e consiste em 360 cópias (dispostas em 72 pentâmeros) da principal proteína do capsídeo, L1, e aproximadamente 12 moléculas da proteína do capsídeo L2 (BAKER; NEWCOMB; OLSON; COWSERT *et al.*, 1991; CHEN; GARCEA; GOLDBERG; CASINI *et al.*, 2000). Possui oito fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs) e uma região não codificadora (*Long Control Region* – LCR), com elementos regulatórios e sítios de ligações para fatores de transcrição viral. As ORFs podem ser divididas em precoces (*E-early*) e tardias (*L-late*). As precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam proteínas não estruturais, e as tardias (L1 e L2) codificam as proteínas do capsídeo (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). A representação do genoma do HPV pode ser visualizada na Figura 1 (SHEN-GUNTHER; CAI; ZHANG; WANG, 2019).

Figura 1 – Representação do genoma do HPV.



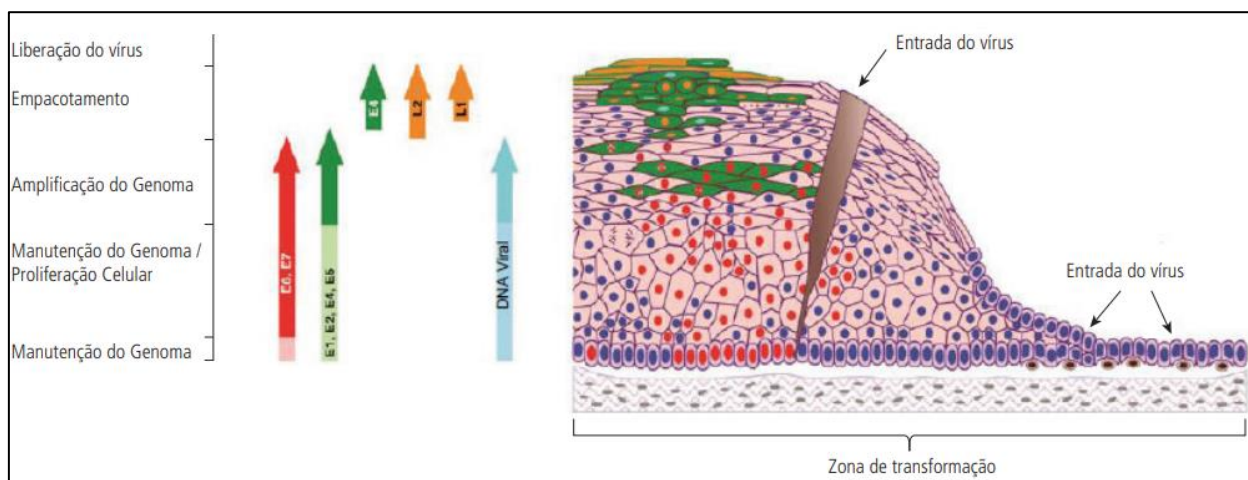
Legenda: Figura esquemática com base na informação genética do HPV 16 (GenBank ID: K02718). Fonte: adaptado de Shen-Gunther et al. (2019).

2.2 O processo de infecção pelo HPV

O epitélio é considerado a principal via biológica usada pelos papilomavírus para a formação de novas partículas virais. Isso porque estes vírus possuem o ciclo de infecção dependente da diferenciação celular dos queratinócitos, ou seja, da diferenciação de um epitélio estratificado (Figura 2) (DOORBAR, 2006; DOORBAR; QUINT; BANKS; BRAVO *et al.*, 2012). As únicas células capazes de sofrer divisão celular no epitélio escamoso estratificado são as células basais. Consequentemente, os papilomavírus devem infectar especificamente essas células para permitir

o estabelecimento de uma infecção persistente (DOORBAR; QUINT; BANKS; BRAVO *et al.*, 2012). O processo de infecção inicia-se acesso dos vírus a estas células da camada basal exposta pelas microlesões no epitélio estratificado, as quais podem ocorrer durante o ato sexual, por exemplo, expondo a camada basal (FRAZER, 2004; MCMURRAY; NGUYEN; WESTBROOK; MCANCE, 2001). Além disso, as células localizadas na junção escamocolunar (JEC) do colo do útero demonstraram ser particularmente acessíveis e vulneráveis à infecção pelo HPV (HERFS; YAMAMOTO; LAURY; WANG *et al.*, 2012). Para que o vírus penetre nas células basais, as proteínas L1 e L2 precisam estabelecer uma ligação com glicosaminoglicanos na membrana plasmática. Mais especificamente L1 é o responsável pela primeira interação com a superfície celular, pois reconhece receptores denominados Glicosaminoglicanos de Heparan Sulfato (HSPG). Entretanto, esse mecanismo de reconhecimento pode variar de acordo com o tipo viral (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011; SHAFTI-KERAMAT; HANDISURYA; KRIEHLER; MENEGUZZI *et al.*, 2003). Após o reconhecimento, uma série de alterações conformacionais ocorrem na superfície viral, e a internalização de alguns tipos de HPVs, como o HPV-16, ocorre por endocitose via clatrina, ou pela via da caveolina, como ocorre com o HPV-31 (BIENKOWSKA-HABA; SAPP, 2011; DOORBAR, 2006; DOORBAR; CUBIE, 2005). Em seguida, ocorre o desnudamento do capsídeo viral, e exposição do genoma e transferência do DNA viral para o núcleo celular com auxílio da proteína L2 (DOORBAR, 2006). Dentro do núcleo, o genoma viral permanece nas células da camada basal, em forma episomal. Nesta fase há um baixo nível de expressão dos genes virais, com ativação do promotor de transcrição dos genes precoces (E1, E2, E4 e E5), suficiente para a manutenção do genoma do vírus, se mantendo com um número baixo de cópias. A expressão dos genes virais é regulada e dependente do programa de diferenciação das células ao longo do epitélio estratificado. Para a produção de novas partículas virais ocorre a amplificação do genoma do HPV, de modo que nas camadas basais a expressão dos genes precoces contribui para a manutenção do genoma viral e indução da proliferação celular, aumentando o número de células infectadas. Cerca de 50 a 100 cópias do genoma viral distribuem-se pela célula hospedeira infectada (MCMURRAY; NGUYEN; WESTBROOK; MCANCE, 2001).

Figura 2 – Estágios do ciclo viral do Papilomavírus Humano em epitélio estratificado escamoso e na zona de transformação ou junção escamocolunar (JEC). Expressão das proteínas precoces (E) e tardias (L).



Fonte: Adaptado de Doorbar et al., 2012.

As células da camada basal, infectadas com HPV, não interrompem sua divisão pela ação das proteínas virais as quais interferem na maquinaria celular, favorecendo a replicação viral (DOORBAR, 2006; DOORBAR; QUINT; BANKS; BRAVO *et al.*, 2012; FEHRMANN; LAIMINS, 2003). A amplificação do DNA viral é mediada pelas proteínas de replicação viral E1 e E2. A proteína E2 se liga à nucleotídeos na origem de replicação, recrutando a helicase E1 permitindo a replicação. Esta replicação é inicialmente intensa e é seguida pela replicação de manutenção, durante a qual o genoma viral é mantido com um número de cópias relativamente baixo, de 50 a 100 cópias, mas constante, nas células em proliferação de uma população clonalmente expandida de células infectadas. Finalmente, à medida que a célula infectada completa a diferenciação celular, há mudança para a amplificação do genoma dependente da diferenciação e eventual geração de vírions da progênie (DOORBAR, 2006; MCBRIDE, 2008; 2013; 2017)

Durante a replicação de manutenção, o vírus precisa estabelecer um estado semelhante à fase S em células diferenciadas. Por meio de interações proteína-proteína, as proteínas virais E6 e E7 controlam o ambiente celular, permitindo a replicação viral em células diferenciadas. A fase de manutenção do ciclo de vida viral pode durar meses a anos. Nas camadas superiores dos epitélios diferenciados, o DNA viral é amplificado para um alto número de cópias. A fase vegetativa do ciclo de vida viral requer a resposta de dano ao DNA celular (BRISTOL; DAS; MORGAN, 2017). As proteínas do capsídeo viral se auto agrupam em partículas que encapsidam o DNA viral. À medida que as células se desprendem para o meio ambiente, são liberados vírions infecciosos, completando o ciclo de vida viral (HEBNER; LAIMINS, 2006).

As proteínas expressas precocemente contribuem para a replicação viral e para a formação de novos vírus. A proteína E1 favorece a manutenção do genoma viral na forma episomal. A proteína E2 possui diversas funções. Além de contribuir com E1 aumentando sua afinidade ao seu sítio promotor, age segregando de forma igualitária o DNA viral replicado entre as células do hospedeiro no momento da divisão celular. Possui papel fundamental como fator de transcrição na regulação do promotor viral precoce, controlando assim a expressão dos oncogenes E6 e E7 (DOORBAR, 2006). A função da proteína E4 está pouco elucidada, e parece estar equivocadamente classificada como precoce. Isso porque é detectada somente nas camadas mais diferenciadas do epitélio e seu papel está relacionado principalmente à maturação e liberação das partículas virais. A proteína E5 em HPV não tem atividade de transformação, e está em grande quantidade no complexo de Golgi. Atua inibindo o processamento pH-dependente de peptídeos antigênicos (FRAZER, 2004; ZUR HAUSEN, 1996).

As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são as principais proteínas com capacidade de transformação, atuando sobre proteínas que regulam o ciclo celular. Durante o ciclo de vida viral normal, a expressão de E6 e E7 é regulada pela proteína E2. No entanto, nas lesões cancerosas, o genoma viral encontra-se frequentemente integrado ao DNA da célula, podendo se inserir em locais aleatórios ou em sítios frágeis do cromossomo (*Chromosome Fragile Sites - CFS*), as quais são regiões de alta instabilidade genômica. As integrações mais comumente encontradas em lesões cancerosas ocorrem com interrupções no gene E2 viral. Isso elimina o controle transcricional mediado por E2 resultando no aumento das oncoproteínas E6 e E7. Como o HPV não codifica proteínas para sua replicação, precisa induzir a célula hospedeira a reentrar na fase S do ciclo celular, utilizando sua maquinaria para duplicar seu DNA. Isso ocorre pela ação das proteínas virais, principalmente E6 e E7. Diversas funções têm sido descritas para as proteínas E6 e E7. A proteína E6 liga-se à proteína supressora de tumor p53, alterando sua capacidade funcional e acelerando sua degradação proteolítica dependente de ubiquitina, impedindo a parada nos pontos de checagem do ciclo celular ou encaminhamento da célula para apoptose. Esta proteína também tem a capacidade de ativar a subunidade catalítica da telomerase (hTERT) em células primárias, interrompendo o processo de senescência das células (CROOK; TIDY; VOUSDEN, 1991; KESSIS; SLEBOS; NELSON; KASTAN *et al.*, 1993; SCHEFFNER; WERNESS; HUIBREGTSE; LEVINE *et al.*, 1990). A proteína E7 é capaz de ligar-se à proteína supressora de tumor conhecida como proteína do retinoblastoma (pRb), promovendo sua inativação e interrompendo sua interação com o fator E2F. As proteínas Rb são as principais reguladoras do ciclo celular. Na forma hipofosforilada, Rb controla a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular por meio da ligação de E2F. Em células normais, a fosforilação de Rb por complexos de

ciclina-quinase conduz à liberação de E2F e, por consequência, a transcrição de genes da fase S. E7 pode substituir esse controle normal do ciclo celular por meio da ligação e degradação de Rb, libertando a ação E2F continuamente. Esta proteína viral também induz a degradação de pRb pela via de proteólise dependente de ubiquitina e inibe os inibidores de quinases dependentes de ciclina p21 e p27. Além disso, células que expressam E7 possuem números anormais de centrôsomos, formando tetrassomias e causando total instabilidade genômica nas células. Todos esses eventos reunidos têm sido suficientes para o processo de immortalização de queratinócitos primários humanos (BARBOSA; EDMONDS; FISHER; SCHILLER *et al.*, 1990; DYSON; HOWLEY; MÜNGER; HARLOW, 1989; FEHRMANN; LAIMINS, 2003; HEBNER; LAIMINS, 2006; MÜNGER; PHELPS; BUBB; HOWLEY *et al.*, 1989).

2.3 O HPV e a evasão da resposta imune do hospedeiro

A pele atua como a primeira linha de defesa contra diversos microrganismos patogênicos. As células epiteliais contribuem na liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas. As citocinas incluem o fator de crescimento β (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferons tipo 1 (IFN- α e IFN- β), que são produzidos por outros tipos celulares. Contudo, isso não é suficiente para conter infecções como aquelas estabelecidas pelo HPV. A resposta imune adquirida é mediada pela combinação de mecanismos humorais (anticorpos) e celulares. A resposta imune mediada por células é coordenada pela ação de diversas citocinas presentes, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, interferons, entre outras, produzidas em diversas etapas da resposta imune. Essas citocinas podem ser liberadas por vários tipos celulares, como linfócitos T, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células *natural killers* (NK). A ação conjunta entre as citocinas bem como das células ativadas contribuem na contenção das infecções virais (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004). As citocinas TGF- β e TNF- α são descritas como potentes inibidores da proliferação de queratinócitos, desempenhando um importante papel no controle do crescimento dessas células. Adicionalmente, a atividade antitumoral e antiproliferativa de TNF- α pode ser um importante fator na regressão de lesões e tumores induzidos pela infecção persistente por HPV (KYO; INOUE; HAYASAKA; INOUE *et al.*, 1994; WOODWORTH; NOTARIO; DIPAOLO, 1990).

O HPV possui diversos mecanismos de evasão da resposta imune. A intracelularidade do vírus interfere na ação de anticorpos na adsorção e liberação viral. A infecção por HPV não tem características citolíticas e não ocorre o recrutamento da resposta inflamatória satisfatória. As proteínas do HPV podem atuar desregulando fatores relacionados à montagem da resposta imune. A interferência viral na maquinaria celular inclui mudanças no processamento de peptídeos, os

quais são reconhecidos pelo complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* – MHC) e expressão da cadeia pesada de MHC de classe 1, impedindo a montagem de resposta imune eficiente (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007). As proteínas virais também podem interferir nas atividades antiproliferativas e antitumorais de TNF- α , sendo que essa resistência pode ser considerada como papel chave na patogênese do HPV no câncer cervical. Além de TNF- α , as atividades de IL-1 e IL-6 também estão alteradas durante a infecção por HPV, podendo contribuir com a proliferação das células tumorais (BOCCARDO; MANZINI BALDI; CARVALHO; RABACHINI *et al.*, 2010; BOCCARDO; NOYA; BROKER; CHOW *et al.*, 2004).

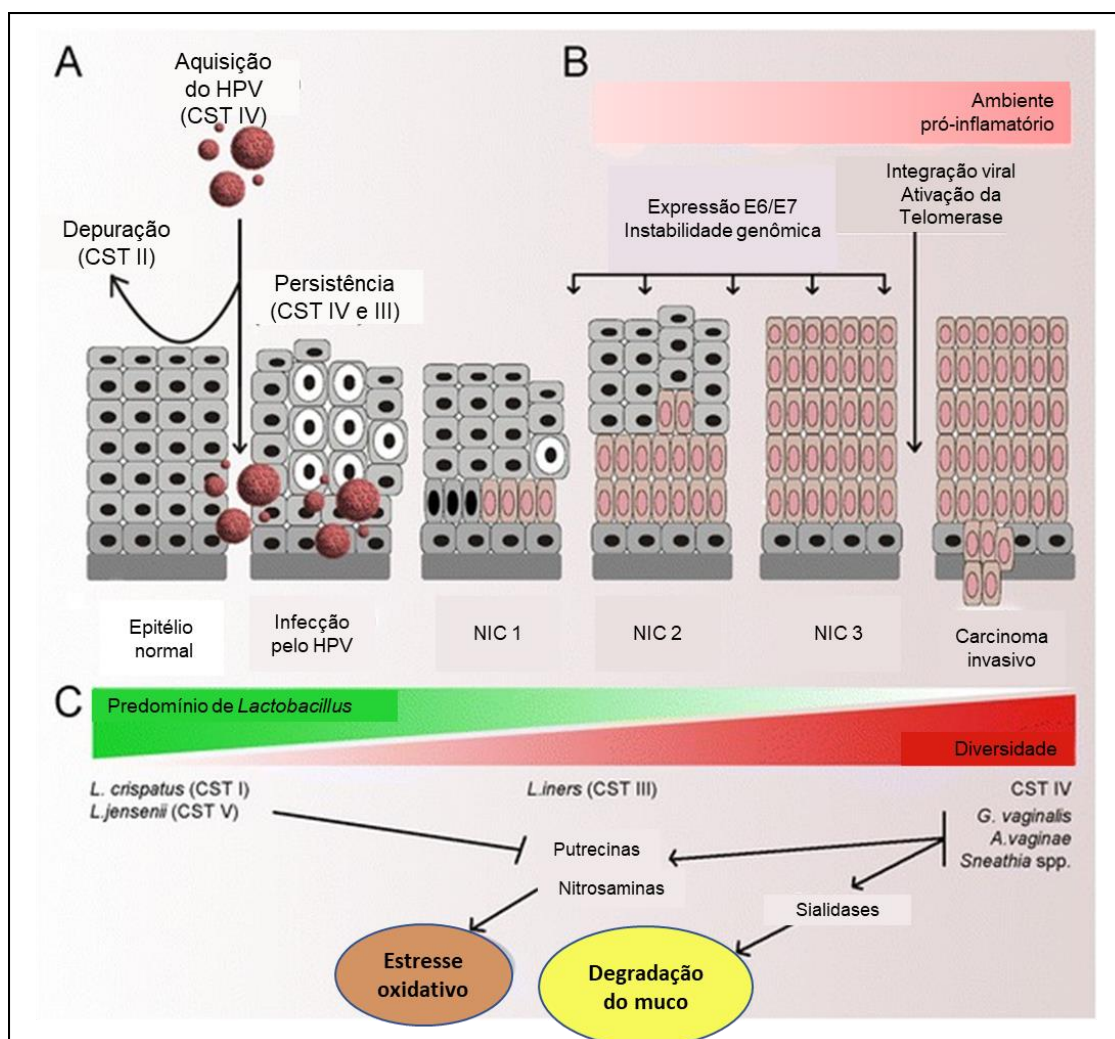
2.4 HPV, cofatores e o câncer cervical

Os HPV 16 e HPV 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervicais invasivos e é considerada a IST mais prevalente. Apesar da alta prevalência e suas características de imortalização e transformação celular, a maioria das infecções por HPV de alto risco não causa lesões visíveis, podendo ser rapidamente eliminadas pela resposta imune. No entanto, em pequeno número de mulheres, estas infecções não são eliminadas e permanecem por anos. Sabe-se que a infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras de carcinoma de colo uterino. Contudo, não se compreende o que favorece as infecções persistentes entre diferentes indivíduos. A associação com cofatores, inerentes ao hospedeiro e/ou a presença de agentes infecciosos externos, tem motivado diversos estudos que justifiquem a progressão da infecção pelo HPV (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; CARTER; DING; ROSE, 2011; IARC, 2007; MUÑOZ; BOSCH; DE SANJOSÉ; HERRERO *et al.*, 2003; MUÑOZ; CASTELLSAGUÉ; DE GONZÁLEZ; GISSMANN, 2006; SCHLECHT; KULAGA; ROBITAILLE; FERREIRA *et al.*, 2001).

O papel de micro-organismos que compõem a microbiota vaginal natural e transitória tem sido relacionado com a aquisição, depuração e persistência do HPV (MITRA; MACINTYRE; MARCHESI; LEE *et al.*, 2016). São descritos 5 tipos diferentes de microbiomas vaginais, conhecidos como CST (*Community State Types*). Os CST I, II, III e V são globalmente dominados por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus jensenii* respectivamente, apresentando pouca heterogeneidade microbiana. O CST IV está associado a maior diversidade de micro-organismos. Entretanto, apresenta baixa quantidade ou é desprovido totalmente de *Lactobacillus* spp., os quais podem colonizar em conjunto com bactérias estritamente anaeróbias ou facultativas tais como *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Fingoldia*, *Streptococcus*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus* e

Peptoniphilus. A depleção de *Lactobacillus* e a colonização de alguns destes e outros micro-organismos podem levar a disbioses, tais como a vaginose bacteriana (VB) (DE CASTRO-SOBRINHO; RABELO-SANTOS; FUGUEIREDO-ALVES; DERCHAIN *et al.*, 2016; GILLET; MEYS; VERSTRAELEN; VERHELST *et al.*, 2012; KING; JAMIESON; WIENER; CU-UVIN *et al.*, 2011; MITRA; MACINTYRE; MARCHESI; LEE *et al.*, 2016). A participação de diferentes micro-organismos causadores de VB e de IST no processo de desenvolvimento das lesões de colo de útero e a progressão para neoplasias são motivo de discussão na literatura (Figura 3) (GUIJON; PARASKEVAS; RAND; HEYWOOD *et al.*, 1992; KLEIN; GONZALEZ; SAMWEL; KAHESA *et al.*, 2019; LIN; KOUZY; ABI JAOUDE; NOTICEWALA *et al.*, 2020; QUAN; DONG; YANG; CHEN *et al.*, 2019; USYK; ZOLNIK; CASTLE; PORRAS *et al.*, 2020). Acredita-se que a infecção persistente por HPV no epitélio cervical seja facilitada por processos inflamatórios causados por outros agentes das ISTs, tais como os que são responsáveis por distúrbios tais como cervicite e vaginose bacteriana (SHIPITSYNA; ROOS; DATCU; HALLÉN *et al.*, 2013). A presença de micro-organismos causadores de infecções sexualmente transmissíveis poderia interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento de lesões cervicais, atuando como cofatores para a persistência e progressão das infecções por HPVs de alto risco. A inflamação do colo do útero pode ser genotóxica, atuando como provável mecanismo de interação entre o HPV e agentes infecciosos (CASTLE; GIULIANO, 2003; IARC, 2007; IARC-MONOGRAPHS, 2012). A influência desses agentes e sua associação com o HPV na carcinogênese cervical ainda não foi totalmente conhecida, e ainda são poucos os estudos que avaliam a potencial aplicabilidade na detecção e quantificação de tais agentes nos programas de triagem.

Figura 3 – Papel da microbiota e de patógenos responsáveis por disbioses no processo de desenvolvimento do câncer cervical.



Legenda: Resumo dos mecanismos potenciais que associam a Microbiota Vaginal (MBV) à doença cervical. CSTs (Community State Types) = tipos diferentes de microbiomas vaginais. CSTs I: *Lactobacillus crispatus*; CSTs II, *Lactobacillus gasseri*; CSTs III: *Lactobacillus iners*; CSTs IV: *Lactobacillus*, *Sneathia amnii* e *Fusobacterium*; CST V: *Lactobacillus jensenii*. A) A composição da MBV parece estar associada à aquisição e persistência da infecção pelo HPV, e o CST II, em particular, está associado à depuração mais rápida de uma infecção aguda pelo HPV. B) A disbiose pode resultar em um ambiente pró-inflamatório, que pode facilitar várias das etapas necessárias na transformação viral, incluindo a expressão de E6 e E7, instabilidade genômica, integração viral e ativação da telomerase, necessárias para a carcinogênese. C) Maior diversidade microbiana e baixa concentração de *Lactobacillus* spp. foi associado ao aumento da gravidade da NIC. Espécies que compõem a MBV de alta diversidade podem produzir sialidases que causam degradação do muco, predispondo o epitélio cervical a danos nos tecidos, além de produzir aminas biológicas responsáveis pelo estresse oxidativo, um mecanismo chave na carcinogênese. Certas espécies *Lactobacillus* spp. foi demonstrado que limpa essas aminas e, portanto, sua presença pode reduzir o risco de dano oxidativo. *L. iners* não parece compartilhar muitos dos mecanismos de proteção de outras espécies de *Lactobacillus* e, portanto, parece intermediário em sua capacidade de prevenir a doença cervical. Fonte: Adaptado de Mitra et al. (2016).

O estudo de cofatores, principalmente aqueles relacionados a outros agentes infecciosos sexualmente transmissíveis, tem sido difícil por conta da multiplicidade de organismos infecciosos. Análises restritas a indivíduos HPV-positivos têm sido consideradas a melhor alternativa analítica

para o controle desse tipo de confusão. Alguns agentes, tais como *Chlamydia trachomatis*, assim como a inflamação associada, têm sido mostrados como um possível cofator uma vez que a inflamação causada no colo uterino pode levar a danos genotóxicos, atuando como um mecanismo provável para a interação entre o HPV (CASTLE; GIULIANO, 2003; IARC, 2007; IARC-MONOGRAPHS, 2012; SMITH; MUÑOZ; HERRERO; ELUF-NETO *et al.*, 2002; WOHLMEISTER; VIANNA; HELFER; GIMENES *et al.*, 2016; ZHU; SHEN; LUO; ZHANG *et al.*, 2016). Outros micro-organismos responsáveis por IST também têm sido relacionados como possíveis cofatores para o desenvolvimento do câncer cervical, dentre eles, podemos citar os micro-organismos da classe *Mollicutes* (IARC-MONOGRAPHS, 2012; MARQUES; UENO; BUZINHANI; CORTEZ *et al.*, 2010; ROTTEM, 2003; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005; YE; SONG; ZENG; LI *et al.*, 2018). De maneira similar, mais estudos precisam ser realizados para a melhor compreensão desses possíveis agentes bem como dos processos inflamatórios envolvidos, e sua associação com a infecção viral no processo de carcinogênese.

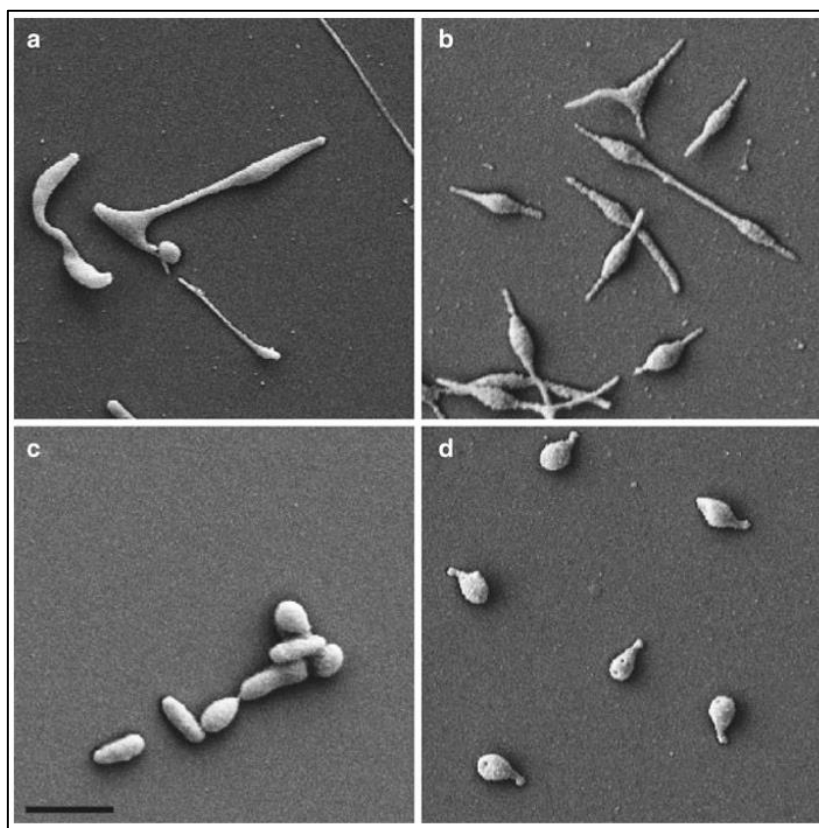
2.5 Características gerais dos *Mollicutes*

Micoplasma é um termo genérico e informal utilizado para quaisquer micro-organismos pertencentes à classe *Mollicutes*. A classe é composta por quatro ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*), sete famílias (*Mycoplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Mycoplasmatales*), *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Incertae sedis* (ordem *Acholeplasmatales*) e *Anaeroplasmataceae*), 11 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Phytoplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*) e mais de 200 espécies. A família *Mycoplasmataceae* contém os principais microrganismos de interesse médico, dentre os quais estão os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Enquanto *Ureaplasma* possui sua base filogenética bem definida pela sequência dos genes de rRNA, *Mycoplasma* é encontrado em pelo menos três linhagens filogenéticas ou grupos. O primeiro grupo é o "tipo espécie", que contém *Mycoplasma mycoides* (além de *capricolum*, *cottewii*, *putrefaciens* e *yeatsii*), que na verdade é mais estreitamente relacionada com o gênero *Entomoplasma* da ordem *Entomoplasmatales*, do que para a maioria das outras espécies de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. O segundo grupo, chamado de "grupo *pneumoniae*", inclui tanto o gênero *Ureaplasma* como quatro clusters de *Mycoplasma* (clusters "*fastidiosum*", "*hemotrophic*", "*muris*" e "*pneumoniae*"). O terceiro grupo, chamado de "grupo *hominis*", inclui os oito clusters restantes de *Mycoplasma* "*bovis*"

(clusters “*equigenitalium*”, “*hominis*”, “*lipophilum*”, “*neurolyticum*”, “*pulmonis*”, “*sualvi*” e “*synoviae*”) (BERGEY'S, 2010; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Estes micro-organismos possuem características peculiares em relação às demais bactérias. São procariotos pequenos (0,2–0,3 μm), totalmente desprovidos de parede celular e, portanto, resistentes a antibióticos β -lactâmicos (WOESE; MANILOFF; ZABLEN, 1980). Possuem pequeno genoma (0,58–2,20 Mb), sendo consideradas as menores e mais simples bactérias auto-replicativas (BOVÉ, 1999). Suas formas variam de cocoides, piriformes a filamentosas e algumas espécies possuem protuberância celular denominada de “bleb” que também contribui na aderência à célula do hospedeiro (Figura 4) (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Possuem baixo conteúdo G+C (23-40%) (TANAKA; ANDACHI; MUTO, 1991; TOTH; HARRISON; SEARS, 1994). São nutricionalmente exigentes, e portanto, são parasitas em diversos hospedeiros (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003). No cultivo em meio sólido, as colônias possuem de 50 a 500 μm de diâmetro e têm aspecto de “ovo frito”. Incorporadas ao ágar, as colônias têm uma zona central opaca, granular e refringente e outra plana e translúcida na superfície do meio. No entanto, esta morfologia depende das condições de crescimento, idade da cultura e da concentração do ágar. Em meio líquido, o crescimento geralmente não causa turvação, provocando a alteração de cor no caldo devido à adição de um indicador de alteração de pH como o vermelho de fenol (RAZIN, 2012; RAZIN; TULLY, 1995; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Figura 4 – Morfologia celular diversa no gênero *Mycoplasma*.



Legenda: Microscopia eletrônica de varredura de (a) *Mycoplasma penetrans*, (b) *Mycoplasma pneumoniae*, (c) "*Mycoplasma insons*", e (d) *Mycoplasma genitalium*. Barra = 1 μm . Fonte: Adaptado de BERGEY'S et al. (2010).

Algumas espécies possuem vários tipos de fatores de virulência. Fatores como adesinas e proteínas acessórias, estruturas polissacarídicas extracelulares e lipoproteínas de membrana pró-inflamatória ou pró-apoptótica são produzidas por várias espécies. Algumas delas excretam subprodutos tóxicos do metabolismo intermediário, incluindo o peróxido de hidrogênio, radicais superóxido ou amônia. Outros fatores como endopeptidases extracelulares, nucleases e glicosidases parecem distribuídos irregularmente entre espécies e gênero. Inclui-se a motilidade, a formação de biofilme ou a invasão intracelular facultativa. Entre as espécies mais estudadas, verificou-se também a variação dos antígenos de superfície que contribuem na evasão das respostas imunes adaptativas dos hospedeiros. Várias espécies foram capazes de suprimir ou estimular as células imunes do hospedeiro alterando receptores e citocinas (BERGEY'S, 2010). Adicionalmente, descreveu-se a capacidade de aderir e/ou invadir células fagocíticas e não-fagocíticas, tais como células epiteliais dos tratos respiratório, urogenital, gastrointestinal, das glândulas mamárias e até mesmo de olhos e articulações (BIERNAT-SUDOLSKA; SZOSTEK; ROJEK-ZAKRZEWSKA; KLIMEK *et al.*, 2011; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). A grande maioria dos mollicutes possui colesterol incorporado à membrana celular que protege em parte a lise

celular em ambientes hipertônicos. Também existem proteínas de membrana ligadas ou não a lipídios. Algumas também evidenciaram potencial na modulação da resposta imune do hospedeiro (RAZIN, 2012; RAZIN; HAYFLICK, 2010; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003; YAVLOVICH; TARSHIS; ROTTEM, 2004).

A adesão celular de algumas espécies indicou ser o principal fator de virulência, pela interferência nos receptores e nos mecanismos de transporte celular. Muitas espécies produzem enzimas como fosfolipases, nucleases, proteases e fosfatases, que podem alterar ou degradar componentes celulares. Esses eventos têm potencial de ativar cascatas e vias de sinalização (BENDJENNAT; BLANCHARD; LOUTFI; MONTAGNIER *et al.*, 1999; LO; HAYES; KOTANI; PIERCE *et al.*, 1993; ROSENSHINE; FINLAY, 1993; ROTTEM; NAOT, 1998; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Pelo genoma reduzido, possuem limitada capacidade de biossíntese, que por sua vez competem com as células do hospedeiro pelos nutrientes prejudicando a divisão e crescimento celular (ROTTEM, 2003; ROTTEM; NAOT, 1998). Com genomas reduzidos ou minimalistas, os mollicutes estão entre os procariontes mais nutricionalmente exigentes. São considerados comensais e patógenos pela dependência do hospedeiro atender os requisitos nutricionais. Estas bactérias são limitadas no metabolismo intermediário e dificultam a utilidade dos testes bioquímicos convencionais para identificação. As espécies estudadas possuem sistemas respiratórios truncados, a via do ciclo do ácido tricarboxílico é incompleta e há ausência de quinonas ou citocromos impedindo a fosforilação oxidativa. Desta maneira, são gerados baixos níveis de ATP por meio da glicólise ou da via da arginina di-hidrolase. As espécies fermentativas catabolizam glicose ou outros carboidratos para produzir ATP e produtos ácidos e, conseqüentemente, diminuem o pH do meio. As espécies não fermentativas hidrolisam a arginina para produzir amônia, ATP e dióxido de carbono e, conseqüentemente, elevam o pH do meio. O gênero *Mycoplasma*, carece de atividade de NADH oxidase dependente de oxigênio. No entanto, o gênero *Ureaplasma* carece de atividades de hexoquinase ou arginina desaminase, mas possuem ureases que hidrolisam a ureia em CO₂ e NH₃ para geração de energia e crescimento. Apesar de características em comum entre mollicutes, existem variações de acordo com os gêneros e espécies estudadas (BERGEY'S, 2010).

Quando analisamos na literatura sobre a associação de *Mollicutes* com o câncer cervical, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* têm sido detectados e associados com distúrbios do trato urogenital, que inclui as lesões cervicais (IARC-MONOGRAPHS, 2012; MARQUES; UENO; BUZINHANI; CORTEZ *et al.*, 2010; ROTTEM, 2003; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Um estudo de revisão sistemática com metanálise realizado por Ye *et al.* (2018) avaliou a associação entre a infecção por micoplasmas genitais e

infecções por HPV, citopatologia cervical anormal e câncer cervical buscando apenas estudos epidemiológicos de seção transversal, caso-controle ou coorte. Observaram que *U. urealyticum* e *M. genitalium* podem aumentar o risco de infecção por HPV de alto risco, enquanto *U. urealyticum*, *U. parvum* e *M. hominis* podem aumentar o risco de citopatologia cervical anormal (YE; SONG; ZENG; LI *et al.*, 2018). Entretanto, resultados de estudos epidemiológicos isolados não permitem avaliar características peculiares de cada micro-organismo no estabelecimento de infecções. Assim, os estudos “in vitro” e em modelos animais necessitam de expansão e aprimoramento para compreender melhor a alteração da homeostase dos hospedeiros pelos micro-organismos da classe dos *Mollicutes* para o desenvolvimento de doenças.

2.5.1 *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium, cepa G-37, possui genoma de 0,58 Mb, conteúdo G+C de aproximadamente 31% e cerca de 475 fases abertas de leitura (ORFs) (FRASER; GOCAYNE; WHITE; ADAMS *et al.*, 1995). O primeiro relato de isolamento da cepa foi obtido por Tully em 1981 a partir de duas amostras de swab uretral de homens com uretrite não gonocócica (UNG). Na ocasião, foi encontrado, nos esfregaços de amostra uretral, a presença de clamídia, *Ureaplasma* spp., *M. hominis*, e outro microrganismo que por vezes revelava motilidade em forma espiral. Após inocularem as amostras em meio SP4, recuperaram em cultura este último microrganismo, que seria o *M. genitalium* (TULLY; TAYLOR-ROBINSON; COLE; ROSE, 1981). *Mycoplasma genitalium* predominantemente apresenta-se em forma de “garrafa” sendo a estrutura terminal envolvida na adesão às superfícies celulares (Figura 5). Possui entre 0,6 e 0,7 μm no comprimento, de 0,3 a 0,4 μm na largura da base e de 0,06 a 0,08 μm na extremidade. Ao microscópio eletrônico de transmissão, evidenciou-se também a tripla camada na membrana com 7,5 a 10 nm de largura sendo a camada intermediária mais eletrodensa em relação às demais. Apresentam motilidade por deslizamento ou por movimentos rotatórios em sentido horário, graças à sua estrutura terminal, podendo alcançar uma velocidade de locomoção de 0,1 $\mu\text{m}/\text{s}$. A proteína de adesão MgPa foi reconhecida por desempenhar papel fundamental na adsorção a eritrócitos, células VERO e células epiteliais cervicais (GLASS; LEFKOWITZ; GLASS; HEINER *et al.*, 2000; JENSEN, 2004; JENSEN; ULDUM; SØNDERGÅRD-ANDERSEN; VUUST *et al.*, 1991; KRAUSE; LEITH; WILSON; BASEMAN, 1982). As proteínas associadas a membranas (LAMPs) são lipoproteínas bacterianas expressas na superfície, e que são as principais estruturas de interação com as células do hospedeiro. Demonstram ser biologicamente ativas e são potentes iniciadores de reações inflamatórias em infecções por micoplasmas. Estudos têm demonstrado que LAMPs

podem induzir a ativação de NF- κ B via TLR1, TLR2, TLR6 em variadas linhagens celulares, ativando-as para produzir citocinas pró-inflamatórias e induzir apoptose e necrose (HE; WANG; ZENG; YOU *et al.*, 2014; ROTTEM, 2003).

Figura 5 – Célula de *M. genitalium* (G-37).



Legenda: A seta indica a porção terminal com a qual a célula adere às células hospedeiras. Fonte: Tully e Taylor-Robinson, 1981.

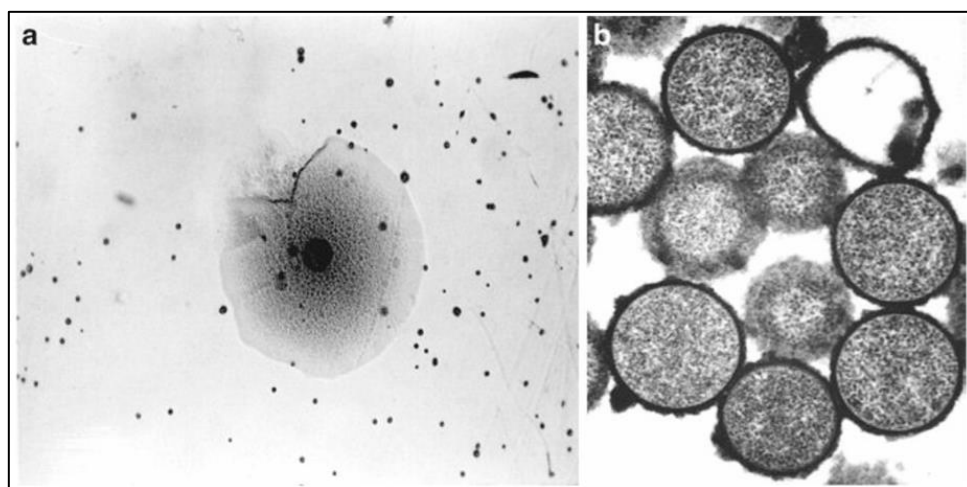
A prevalência mundial deste micoplasma varia entre 4 a 42% (FALK; FREDLUND; JENSEN, 2005; SETHI; SINGH; SAMANTA; SHARMA, 2012). No Brasil, os estudos ainda são escassos, mas a prevalência varia de 0,9 a 32%, dependendo do tipo de população estudada (ANDERSEN; SOKOLOWSKI; ØSTERGAARD; KJØLSETH MØLLER *et al.*, 2007; CAMPOS; LOBÃO; SELIS; AMORIM *et al.*, 2015). Diferentes estudos mencionam a associação de *M. genitalium* com uretrite não gonocócica em homens (JENSEN, 2004; TAYLOR-ROBINSON; GILROY; THOMAS; HAY, 2004; TAYLOR-ROBINSON; HORNER, 2001; TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011) e diversas doenças urogenitais em mulheres (BASEMAN; CAGLE; KORTE; HERRERA *et al.*, 2004), como doença inflamatória pélvica (DIP) (HAGGERTY; TAYLOR, 2011), corrimento vaginal (ANDERSEN; SOKOLOWSKI; ØSTERGAARD; KJØLSETH MØLLER *et al.*, 2007; KORTE; BASEMAN; CAGLE; HERRERA *et al.*, 2006; WALKER; FAIRLEY; BRADSHAW; TABRIZI *et al.*, 2011), uretrite (MOI; REINTON; MOGHADDAM, 2009), cervicite (FALK; FREDLUND; JENSEN, 2005; JENSEN, 2004) endometritis, endometriose e salpingite (CAMPOS; MARQUES; REZENDE; BARBOSA *et al.*, 2018; COHEN; MANHART; BUKUSI; ASTETE *et al.*, 2002; COHEN; MUGO; ASTETE; ODONDO *et al.*, 2005). O interesse em compreender melhor o papel de *M. genitalium* tem aumentado. O informe mais recente do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) sobre tratamento das ISTs, publicado em 2015, discute *M. genitalium* sob a ótica de uma IST emergente (WORKOWSKI, 2015). Atualmente, diferentes estudos são realizados para comprovar que *M. genitalium* é de fato

uma nova IST (CAZANAVE; MANHART; BÉBÉAR, 2012; HAGGERTY; TAYLOR, 2011; MCGOWIN; ANDERSON-SMITS, 2011; MUNOZ; GOJE, 2016; SETHI; SINGH; SAMANTA; SHARMA, 2012).

2.5.2 *Mycoplasma hominis*

Mycoplasma hominis, cepa PG21, possui genoma de 0,67 Mb, conteúdo G+C de 27% e cerca de 537 fases abertas de leitura (ORFs) (PEREYRE; SIRAND-PUGNET; BEVEN; CHARRON *et al.*, 2009). As células possuem formato cocoide a filamentoso. A motilidade para esta espécie não foi detectada. Em meios sólidos produz colônias em forma de “ovo frito”, com diâmetros de 0,2 a 0,9 mm (Figura 6). Possuem bom crescimento a 37°C em meio SP-4 suplementado com arginina. Os elementos genéticos móveis mais encontrados em micoplasmas são as sequências de inserção (IS). A IS encontrada em *M. hominis* foi ISMhom1, membro da família IS30 (BERGEY'S, 2010).

Figura 6 – Características de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*.



Legenda: (a) Colônias isoladas de *Ureaplasma urealyticum*, cercando uma única grande colônia de *Mycoplasma hominis* em uma superfície de ágar sólido para micoplasmas. Colônias de *Ureaplasma urealyticum* comumente têm diâmetros de 15-125 µm; o diâmetro da colônia de *Mycoplasma hominis* mostrada é de aproximadamente 0,9 mm. (b) Micrografia eletrônica de transmissão de *Ureaplasma urealyticum*, sorotipo 4, cepa 381/74, que mostra células com morfologia cocoide, cápsula extramembranosa coradas com vermelho de rutênio, ausência de parede celular, apenas uma membrana e conteúdos citoplasmáticos aparentemente simples em que apenas ribossomos são evidentes. Diâmetros celulares de 485-585 nm. Fonte: Adaptado de BERGEY's *et al.* (2010).

O primeiro isolamento do micro-organismo foi proveniente de um abscesso do duto das glândulas de Bartholin de um paciente em 1937. Na época, não havia sistema de identificação fenotípica das espécies de *Mycoplasma*. Contudo, acredita-se que tenha sido *M. hominis* pelo fato

de os isolados descritos formarem colônias grandes e serem mais comumente encontradas no trato genital (DIENES; EDSALL, 1937; 1939; KLIENEGER, 1938; KLIENEGER; STEABEN, 1937).

A patogênese de *M. hominis* envolve a adesão às células do hospedeiro com evidências de que as proteínas de membrana são as responsáveis. Além disso, os danos provocados por enzimas de membrana como fosfolipases e aminopeptidases, ou pela produção de amônia, também são possíveis fatores que contribuem na patogênese (KRAUSE; LEITH; WILSON; BASEMAN, 1982; TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011). O estudo realizado por Logunov et al. (2008) demonstrou que infecção por *M. hominis* diminui a expressão da proteína supressora de tumor p53, sugerindo possível efeito cancerígeno e mutagênico deste e de outros micoplasmas (LOGUNOV; SCHEBLYAKOV; ZUBKOVA; SHMAROV *et al.*, 2008). *M. hominis* pertence à microbiota do trato urogenital e, portanto, dificulta a determinação do papel desta espécie nas doenças. Todavia, evidências indiretas refletem o potencial patogênico desta espécie, como manifestado em diversos estudos (HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER *et al.*, 2013; ZHANG; FANG; LAN; LUO, 2007; ZHANG; LO, 2007). *Mycoplasma hominis* ocorre mais frequentemente no trato urogenital das mulheres do que nos homens e está presente nos casos de vaginite, vaginose bacteriana ou infecções intrauterinas (KEANE; THOMAS; GILROY; RENTON *et al.*, 2000). Também está claramente associado a septicemias e infecções respiratórias e a transplantes ou infecções articulares em pessoas imunossuprimidas. Após descoberta de que *Gardnerella vaginalis* não era o único agente etiológico responsável pela vaginose bacteriana (VB), diversos estudos ocorreram para investigar o papel de *M. hominis* (CAMPOS; LOBÃO; SELIS; AMORIM *et al.*, 2015; RODRIGUES; FERNANDES; HADDAD; PAIVA *et al.*, 2011). Atualmente, é aceita a participação de *M. hominis* na VB, mas o seu papel neste distúrbio ainda é controverso (ARYA; TONG; HART; PRATT *et al.*, 2001; COX; WATT; MCKENNA; COYLE, 2016; PEKMEZOVIC; MOGAVERO; NAGLIK; HUBE, 2019; SANCHEZ-GARCIA; CONTRERAS-PAREDES; MARTINEZ-ABUNDIS; GARCIA-CHAN *et al.*, 2019). Tem sido associado à doença inflamatória pélvica (DIP) e foi sido isolado no líquido amniótico de mulheres que apresentavam corioamnionite e subsequentemente aborto, possibilitando, desta maneira, a associação deste micoplasma com tais eventos (GUPTA; GUPTA; MITTAL; CHANDRA *et al.*, 2009). Além desses distúrbios, estudos recentes têm associado a presença de *M. hominis* com HPV de alto risco em lesões cervicais (ADEBAMOWO; MA; ZELLA; FAMOOTU *et al.*, 2017; FERIYAWATI; ANGGRANI; NASUTION, 2019; MONGELOS; MENDOZA; RODRIGUEZ-RIVEROS; CASTRO *et al.*, 2015).

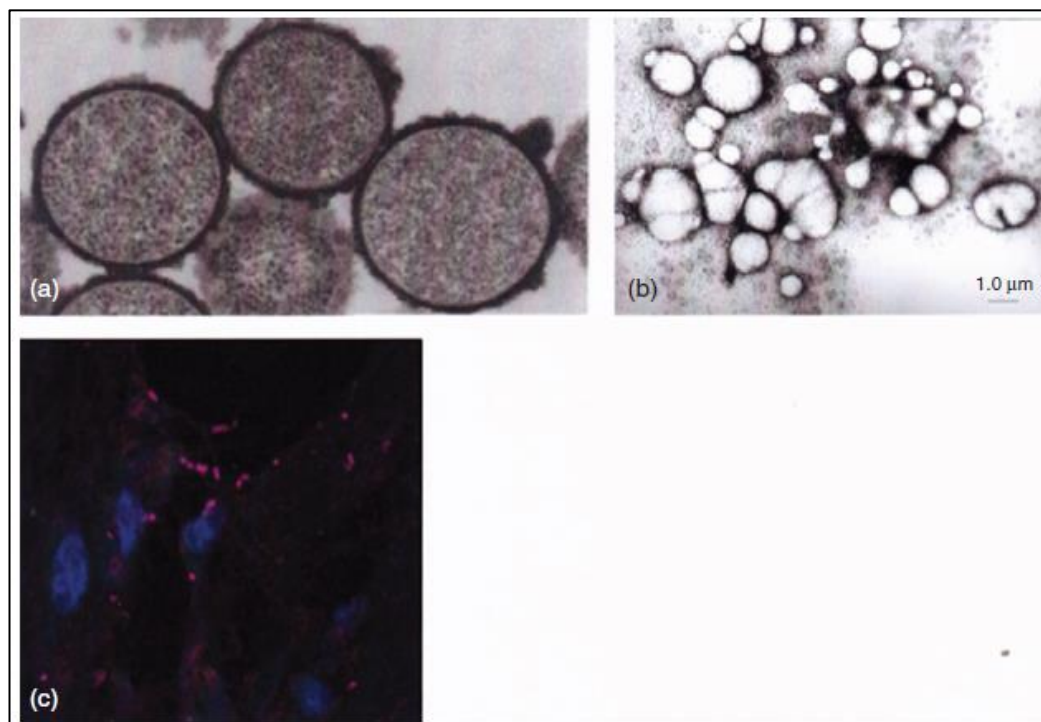
2.5.3 *Ureaplasma spp.*

Os ureoplasmas estão entre os menores seres vivos de vida livre. Foram descritos pela primeira vez em 1954 (SHEPARD, 1954) e o gênero *Ureaplasma* foi estabelecido em 1974 (SHEPARD; LUNCEFORD; FORD; PURCELL *et al.*, 1974), compreendendo os membros da família *Mycoplasmataceae* que hidrolisam a ureia e a utilizam como substrato metabólico para geração de ATP. Anteriormente, a espécie *Ureaplasma urealyticum* era única, mas apresentava 14 sorovares com características distintas, as quais foram divididas em 2 biovars ou clusters: a biovar 1 (com os sorotipos 1, 3, 6 e 14) e biovar 2 (também conhecida como T960, com os sorotipos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13), sendo que essa divisão foi estabelecida inicialmente pela susceptibilidade ao manganês (Mn^{2+}) (ROBERTSON; CHEN, 1984; ROBERTSON; STEMKE, 1982). Com o tempo, verificou-se a necessidade de reclassificar a biovar 1 como nova espécie (KONG; JAMES; MA; GORDON *et al.*, 1999). Dessa forma, a espécie *Ureaplasma urealyticum* biovar 1 passou a ser conhecida como *Ureaplasma parvum*, e a biovar 2 continuou sendo *Ureaplasma urealyticum*. (KONG; JAMES; MA; GORDON *et al.*, 1999; ROBERTSON; STEMKE; DAVIS; HARASAWA *et al.*, 2002; TENG; ZHENG; GLASS; WATSON *et al.*, 1994; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Dentre as 14 sorovares descritas, são verificadas variabilidades quanto ao tamanho do genoma, sendo de 760kpb para sorovares da biovar 1 e 840-1140kpb para sorovares da biovar 2 (ROBERTSON; PYLE; STEMKE; FINCH, 1990). O sequenciamento da serovar 3 por Glass *et al.* (2000) foi verificado baixo conteúdo G+C (25,5%), o menor dentre os *Mollicutes* e um dos menores entre outras bactérias (GLASS; LEFKOWITZ; GLASS; HEINER *et al.*, 2000; TENG; ZHENG; GLASS; WATSON *et al.*, 1994). A análise comparativa entre o genoma das espécies de *Ureaplasma* mostram que os sorovares de *Ureaplasma parvum* (UPA) possuem genomas de 0,75 a 0,78 Mbp e os sorovares de *Ureaplasma urealyticum* (UUR) possuem genoma de 0,84 a 0,95 Mbp. Os sorovares *U. parvum* possuem a média de 608 genes, dos quais ~201 codificam proteínas hipotéticas e os serovares de *U. urealyticum* possuem a média de 664 genes, dos quais ~230 codificam proteínas hipotéticas (PARALANOV; LU; DUFFY; CRABB *et al.*, 2012).

Espécies do gênero *Ureaplasma* apresentam-se como células cocoides com cerca de 500nm de diâmetro; podem aparecer como formas coccobacilares na fase de crescimento exponencial (Figura 7). São imóveis e anaeróbios facultativos. Formam colônias excepcionalmente pequenas (<0,2 mm) em meios sólidos que são descritos como colônias minúsculas (tiny-T) de “ovo frito” ou como colônias de “cabeça de couve-flor” com periferia lobada (Figura 6) (DANDO; SWEENEY; KNOX, 2015). São quimio-organotróficos e, assim como o gênero *Mycoplasma*, espécies de *Ureaplasma* não possuem atividade de NADH oxidase dependente de oxigênio. Ao

contrário de *Mycoplasma*, as espécies de *Ureaplasma* carecem de atividades de hexoquinase ou arginina desiminase, mas produzem potentes ureases que hidrolisam a ureia em CO₂ e NH₃ para geração energia. A temperatura ideal de incubação para as espécies conhecidas é de 35 a 37 °C. Em meios de cultura necessitam pH entre 6,0-6,5, o que favorece a sua alta colonização no trato genital feminino (BERGEY'S, 2010; RODRIGUES; FERNANDES; HADDAD; PAIVA *et al.*, 2011).

Figura 7 – Morfologia celular de ureaplasma.



Legenda: (a) Microscopia eletrônica de transmissão de *U. urealyticum*, serovar 4, cepa 381/74, mostrando morfologia cocoide, cápsulas extramembranas coradas com vermelho de rutênio, ausência de parede celular, membrana celular trilaminar e ribossomos no citoplasma. Os diâmetros das células eram de 485 a 585 nm. (B) Microscopia eletrônica de transmissão de *U. parvum serovar 3*, isolado clínico 442s corado negativamente com acetato de urânio a 1%. Ureaplasmas brotam em diferentes direções, células únicas e agregados são mostrados. (c) Microscopia confocal de varredura a laser, demonstrando coloração indireta por anticorpo fluorescente de ureaplasmas na placenta humana. As células teciduais foram coradas com DAPI e os Ureaplasmas foram corado com Alexa Fluor 586 (rosa). Fonte: adaptado de Dando S. J.; Sweeney, E. L. & Knox, C. L. *et al.* (2015).

Neste sítio anatômico, produzem amônia, aumentando o pH genital e facilitando a colonização de outros microrganismos que são sensíveis ao pH ácido natural (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). *U. parvum* sorovar 3 é mais frequentemente isolado da mucosa genital do que *U. urealyticum* (CASSELL; WAITES; WATSON; CROUSE *et al.*, 1993; GLASS; LEFKOWITZ; GLASS; HEINER *et al.*, 2000). No entanto, em alguns indivíduos, ambas as espécies podem estar presentes (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). *U. urealyticum* está entre os principais microrganismos responsáveis pelo estabelecimento de uretrites não-gonocócicas e não clamidiais (CASSELL; WAITES; WATSON; CROUSE *et al.*, 1993). Pode alterar a evolução da gravidez pela

indução de vaginose bacteriana, cervicite, infecção intrauterina, pneumonia neonatal e pré-eclâmpsia (CASSELL; WAITES; WATSON; CROUSE *et al.*, 1993; PADMINI; UTHRA, 2012; RODRIGUES; FERNANDES; HADDAD; PAIVA *et al.*, 2011). Ureaplasmas podem ser isolados da superfície mucosa da vagina ou cérvix de 40 a 80% de mulheres saudáveis sexualmente ativas (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005). Yamazaki *et al.* (2012), em estudo realizado no Japão com mulheres na primeira consulta pré-natal, observaram por PCR a prevalência de 41,7% para *U. parvum* e 8,9% para *U. urealyticum*. Em estudo prévio do nosso grupo, em análises realizadas pela qPCR, a prevalência de infecção por *U. parvum* foi de 83,4% das mulheres (LOBÃO, 2013).

Analisando a frequência da associação de *U. urealyticum* e *U. parvum* nos distúrbios urogenitais, alguns estudos demonstraram que estes agentes podem interferir indiretamente no desenvolvimento de lesões cervicais permitindo a persistência das infecções por HPV (BIERNAT-SUDOLSKA; SZOSTEK; ROJEK-ZAKRZEWSKA; KLIMEK *et al.*, 2011; BORNSTEIN; RAHAT; ABRAMOVICI, 1995; LUKIC; CANZIO; PATELLA; GIOVAGNOLI *et al.*, 2006). Além disso, *U. urealyticum* foi descrito como causador de danos cromossômicos em cultura de células linfocíticas. Entretanto esse efeito ainda está pouco esclarecido (KUNDSIN; AMPOLA; STREETER; NEURATH, 1971). Verteramo *et al.* (2009) observaram a elevada associação entre a presença de *U. urealyticum* com a infecção por HPV em pacientes com lesões cervicais (VERTERAMO; PIERANGELI; MANCINI; CALZOLARI *et al.*, 2009). Lukic *et al.* (2006) analisaram 239 mulheres com anormalidades no exame citológico. *U. urealyticum* foi detectado em 27% das pacientes com diagnóstico para Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance – ASCUS*), 35% para Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion – LSIL*) e 45% para Lesão Intraepitelial escamosa de alto (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesion – HSIL*), contra 19% para o grupo controle. Evidenciou-se a elevada associação entre as infecções por *U. urealyticum* e HPV (LUKIC; CANZIO; PATELLA; GIOVAGNOLI *et al.*, 2006).

Ramírez-Salazar *et al.* (2011) e Moody & Laimins (2010) observaram que proteínas do HPV estão envolvidas nas alterações do ciclo celular e na apoptose de células (MOODY; LAIMINS, 2010; RAMÍREZ-SALAZAR; CENTENO; NIETO; VALENCIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Entretanto, é notável a necessidade de outros fatores para o estabelecimento da transformação celular para o câncer (ALLAM; ALVAREZ; BROWN; REYES, 2011). Em estudo realizado por Szostek *et al.*, (2014), sugeriu-se que a infecção do trato urogenital por *U. urealyticum* poderia aumentar o risco de câncer do colo do útero devido ao aumento da expressão do oncogene E6 de HPV (SZOSTEK; ZAWILIŃSKA; BIERNAT-SUDOLSKA; KOPEĆ *et al.*, 2014). Apesar de alguns autores demonstrarem a associação entre ureaplasmas e o HPV nas lesões de alto grau

(BIERNAT-SUDOLSKA; SZOSTEK; ROJEK-ZAKRZEWSKA; KLIMEK *et al.*, 2011), outros estudos sugerem que infecções por *U. urealyticum* podem induzir a apoptose (HARADA; TANAKA; KOMORI; TSUJI *et al.*, 2008). Verificou-se efeito clastogênico de alguns sorotipos de *U. urealyticum* em cultura de linfócitos (CUNHA; KOIFFMAN; SOUZA; TAKEI, 1997).

Cinco proteínas de *Ureaplasma* spp. foram inicialmente identificadas como possíveis fatores de virulência: urease, imunoglobulina A protease (IgA), o antígeno MBA (*multiple-banded antigen*), e fosfolipases C e A. Além disso, a presença de cápsula tem sido descrita para *Ureaplasma* spp. No entanto, a virulência desses fatores ainda é incerta, pela ausência de modelos animais (RAZIN; HAYFLICK, 2010; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Como o MBA de *Ureaplasma* spp. são os principais imunógenos reconhecidos durante a infecção, diferenças nas sequências dos sorotipos podem conferir variações nos mecanismos de patogenicidade, incluindo-se na resposta do hospedeiro (EKIEL; FRIEDEK; ROMANIK; JÓŹWIAK *et al.*, 2009; KONG; MA; JAMES; GORDON *et al.*, 2000).

Desta maneira, estudos devem ser continuados com a finalidade de entender melhor o papel das infecções por *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* na modulação celular, colaborando com a persistência das infecções pelo HPV para o estabelecimento de lesões cervicais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a interferência da infecção por *Mollicutes* na viabilidade celular e na modulação das vias de dano ao DNA e da resposta inflamatória de linhagens celulares que expressam ou não oncogenes E6/E7 de HPV 16 e HPV 18.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar a quantificação de *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* e *U. urealyticum* por meio das técnicas de Unidade de Mudança Colorimétrica (CCU) e Unidade Formadora de Colônia (UFC) para as infecções em SiHa, HeLa e em queratinócitos primários humanos (PHK);
- Verificar a capacidade das infecções por *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* e *U. urealyticum* causar alterações na sobrevivência e na proliferação das linhagens SiHa, HeLa e PHK;
- Avaliar se a infecção por *M. hominis* é capaz de levar a alterações celulares suficientemente capazes de alterar o ciclo celular em resposta ao dano ou levar à indução da apoptose nas células SiHa, HeLa e PHK;
- Avaliar se *M. hominis* é capaz de modular a resposta imune de SiHa, HeLa e PHK;
- Avaliar se infecção por *M. hominis* é capaz de alterar a expressão dos genes E6/E7 de HPV 16 e HPV 18 presentes em SiHa e HeLa, respectivamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

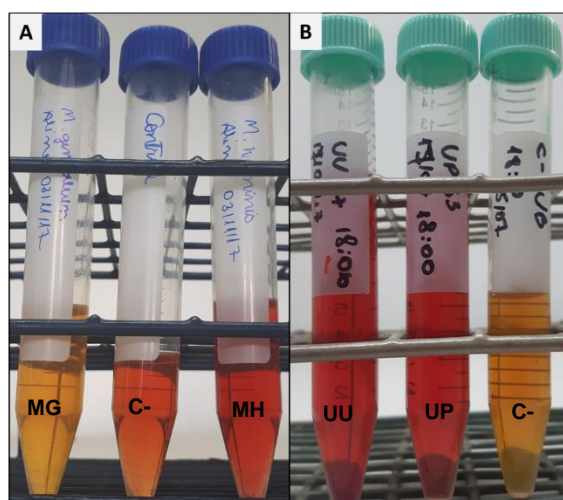
4.1 Crescimento dos micro-organismos utilizados

Foram utilizadas cepas de *M. hominis* ATCC 23114 - PG-21, *M. genitalium* ATCC 33530 - G37, *U. urealyticum* ATCC 27618 - T960 - sorotipo 7 e *U. parvum* ATCC 27815 - sorotipo 3 obtidas do Laboratório de Micoplasmas ICB/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Jorge Timenetsky. O cultivo de *M. genitalium* e *M. hominis* foi realizado em meio SP4 (RAZIN; TULLY, 1995). O cultivo de *U. parvum* e *U. urealyticum* foi realizado em meio UB (ureaplasma broth) (WHITFORD; ROSENBUSCH; LAUERMAN; DIAGNOSTICIANS, 1999). Os meios de cultura foram testados para esterilidade por 24 horas a 37°C. Para excluir a hipótese de contaminação prévia por outros micoplasmas ou ureaplasmas, os meios foram também testados por PCR com “primers” GPO3 e MGSO, os quais são complementares à sequência conservada do gene 16S, e detectam qualquer gênero da classe *Mollicutes* (VAN KUPPEVELD; VAN DER LOGT; ANGULO; VAN ZOEST *et al.*, 1992). As cepas dos microrganismos foram cultivadas inicialmente em 1,0 mL de meio e expandidos para cultura de 10 mL e, em seguida, para 100mL de caldo. O crescimento foi identificado pela alteração de pH do caldo com vermelho de fenol. Na alcalinização, o caldo altera de coloração rosa para vermelho-púrpura, no caso do crescimento de *M. hominis*, pela hidrólise da arginina. No caso de *M. genitalium*, o qual metaboliza glicose, para amarelo. No caso do meio UB, pela mudança da cor laranja para vermelho-púrpura indicando crescimento de *U. parvum* e *U. urealyticum*, pela hidrólise da ureia (Figura 8).

Para as infecções em células, cada 100 mL dos micro-organismos crescidos foram centrifugados previamente a 18000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado duas vezes com PBS 1X estéril, e novamente centrifugado a 18000 g por 30 minutos à 4°C. O sedimento foi homogeneizado em 10 mL (10x) do meio de cultura para crescimento das células. Nos casos de HeLa e SiHa, foi utilizado D10 (DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino -SFB) sem antibiótico. Nos casos de PHK, foi utilizado KGM Gold (*KBM Gold Basal Medium Keratinocyte Growth Medium* – LONZA) devidamente suplementado com *KGM Gold Single Quots Supplement pack* (LONZA), composto por: Hidrocortisona 0,50 mL; Transferrina 0,50 mL; Epinefrina 0,25 mL; Extrato de Pituitária Bovina (BPE) 2,00 mL; hEGF 0,50 mL e Insulina, 0,50 mL. Porém, não foi utilizado o suplemento Sulfato de Gentamicina e Anfotericina (GA-1000) 0,50 mL, para não inibir o crescimento dos *Mollicutes*. Após esse procedimento, os micro-organismos foram divididos em alíquotas de 1 mL em microtubos, e foram armazenados em freezer à -80 °C, até o momento da inoculação. Para

assegurar a quantidade adequadas dos micro-organismos no momento da inoculação, cada amostra dos micro-organismos foi descongelada para determinação da CCU e da UFC, conforme descrito a seguir.

Figura 8 – Alteração de coloração dos meios de cultura devido à mudança do pH após crescimento dos micro-organismos.



Legenda: Da esquerda para a direita: A) (MG) *M. genitalium*; (C-) tubo com caldo SP4 para controle negativo; (MH) *M. hominis* B) (UU) *U. urealyticum*; (UP) *U. parvum*; (C-) tubo com caldo UB para controle negativo. Fonte: Amorim, AT. Laboratório de Micoplasmas – ICB/USP 2018.

4.2 Preparação dos micro-organismos para contagem e infecção em células

O inóculo com mollicutes para infectar culturas celulares deve ser estabelecido, no entanto, a sua enumeração apresenta limitações. A reduzida dimensão destas bactérias (de 0,3 a 0,5 μm) não permite sua observação e contagem por microscopia de luz direta. Desta maneira, os métodos de dispersão ou absorbância de luz que detectam o crescimento celular são inviabilizados (RAZIN, 2012). No presente estudo foram utilizadas as metodologias baseadas pela determinação de unidades de mudança colorimétrica (CCU – *colour change units*) e unidade formadora de colônia (UFC), técnicas usualmente aplicadas aos mollicutes (MOHADJER; KAFTARIANS, 1973; PURCELL; TAYLOR-ROBINSON; WONG; CHANOCK, 1966; RAZIN, 2012; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Para a determinação da CCU, utilizaram-se alíquotas de 20 μL de cultura prévia dos micro-organismos, descongeladas e transferidas em microtubos com 1 mL de caldo estéril. Em seguida foram realizadas diluições decimais em 180 μL de meio SP4 ou UB (10⁻¹ a 10⁻¹²) em microplacas de 96 poços, em triplicatas. As microplacas foram incubadas à 37°C por até 15 dias, para

visualização de mudança de cor em relação ao caldo estéril. Para obtenção das UFC, foram utilizadas alíquotas de 100 µL de um dos microtubos congelados com 1 mL da solução de uso de cada micro-organismo, e realizadas diluições decimais seriadas em 900 µL de meio SP4 ou UB (10^{-1} a 10^{-6}) em microtubos. Para cada microtubo contendo a respectiva diluição e micro-organismo, foram transferidas alíquotas de 100 µL, em triplicata para placas de 50mm com 5mL de ágar SP4 ou UB. As placas inoculadas com as diluições de *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum* foram incubadas em estufa à 37 °C por 7 dias, e as placas para *M. genitalium* foram incubadas à 37 °C em microaerofilia (jarra de anaerobiose) por até 15 dias. Após cada período de incubação, as colônias formadas de cada espécie foram quantificadas de acordo com a diluição e volume inoculado para a determinação das UFC/mL.

4.3 Cultivo das linhagens celulares

Foram utilizados queratinócitos primários humanos (PHK) derivadas de prepúcio de recém-nascidos (Lonza®) em baixas passagens (passagens de 1-3) e linhagens derivadas de carcinomas epidermóides de colo do útero: SiHa ATCC® HTB-35™ (1-2 cópias de HPV-16 integrado) proveniente de um carcinoma de célula escamosa e HeLa ATCC® CLL-2™ (10-50 cópias do HPV 18 integrado), proveniente de um adenocarcinoma.

As células PHK foram cultivadas em meio KGM Gold (*KBM Gold Basal Medium Keratinocyte Growth Medium* (LONZA) suplementado com *KGM Gold Single Quots Supplement pack* (LONZA), contendo: Hidrocortisona 0,50 mL; Transferrina 0,50 mL; Epinefrina 0,25 mL; Extrato de Pituitária Bovina (BPE) 2,00 mL; hEGF 0,50 mL e Insulina, 0,50 mL. Não foram adicionados Sulfato de Gentamicina e Anfotericina (GA-1000) 0,50 mL para não interferir no crescimento dos *Mollicutes*. Para a determinação da curva de crescimento das células, além de queratinócitos normais, foram utilizados queratinócitos transduzidos com os vetores pLXSN Ø e pLXSN contendo os genes E6 e E7 de HPV 16. As células foram preparadas e cedidas pelo laboratório de Oncovirologia, sob supervisão do Prof. Dr. Enrique Boccardo (Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP). Os vetores retrovirais pLXSN Ø e pLXSN HPV16 E6/E7 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY, 1991) foram cedidos pela Dra. Denise Galloway (Human Biology Division and Public Health Sciences at Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, WA, U.S.A. - Addgene plasmid # 52394 ; <http://n2t.net/addgene:52394>; RRID:Addgene_52394). As células PHK pLXSN Ø e PHK pLXSN HPV16 E6/E7 foram cultivadas como as células PHK normais.

As células SiHa e HeLa foram cultivadas em meio Dulbecco Eagle mínimo essencial (DMEM) suplementado com aminoácidos não-essenciais e 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibióticos, e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) (SIADAT-PAJOUH; PERIASAMY; AYSCUE; MOSCICKI *et al.*, 1994).

4.4 Dose infectante e curva de crescimento

Para avaliar os efeitos de cada micro-organismo nas linhagens de células estudadas, foram realizadas infecções com quatro doses diferentes de cada micro-organismo. As doses foram preparadas obedecendo as proporções 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 tomando como base a solução estoque preparada conforme mencionado anteriormente. Para o ensaio da dose infectante, as células foram plaqueadas com densidade de $8,0 \times 10^3$ – $1,5 \times 10^4$ células/mL. Para observar o comportamento da célula durante sete dias de infecção por cada micro-organismo, foi realizada a curva de crescimento das células. Foram utilizadas as multiplicidades de infecção (MOIs) de 0,04-0,6 para *M. hominis*, 0,1-1068 para *M. genitalium*, 6-155 para *U. urealyticum* e 220-6439 para *U. parvum* (Quadro 6) sobre as linhagens de células SiHa, HeLa, PHK normal, PHK com vetor pLXSN vazio e PHK com vetor pLXSN HPV 16 E6/E7 todas obedecendo a uma densidade de $2,5 \times 10^3$ – $8,0 \times 10^3$ células/mL. Todas as células foram cultivadas em microplacas de cultura celular (Costar) de 24 poços, e aguardado de 12-24 horas até que as células aderissem à placa antes da infecção. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada dois dias, apenas com meio de cultura, sem os micro-organismos (HE; WANG; ZENG; YOU *et al.*, 2014; YOU; WU; ZENG; DENG *et al.*, 2008).

Para realização da contagem das células, tanto para curva de crescimento quanto para a dose infectante, as células foram lavadas com PBX 1x, tripsinizadas (0,5% Tripsina-EDTA 1x – Gibco), ressuspensas com meio D10 e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Para a dose infectante, as células foram quantificadas após 72 horas da infecção. Para obtenção da curva de crescimento, as células foram contadas por 7 dias consecutivos (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas).

A partir da curva de crescimento, foi calculado o tempo de duplicação celular, ou *doubling time* (DT) para cada linhagem celular. O DT determina a dinâmica do desenvolvimento da cultura celular como o tempo médio necessário para uma célula concluir o ciclo celular (KORZYŃSKA; ZYCHOWICZ, 2008). Para os cálculos, foi considerado o número de células entre 24h e 96h após infecção, seguindo a fórmula:

$$DT = [(t_2 - t_1) \times \log(2)] / (\log n_2 - \log n_1).$$

O efeito das infecções na duplicação de cada linhagem celular foi calculado pela taxa de duplicação, dividindo-se o tempo de duplicação (DT) das células infectadas pelo tempo de duplicação do controle (BARRÓN; ROMAN-BASSAURE; SÁNCHEZ-SANDOVAL; ESPINOSA *et al.*, 2015), seguindo a fórmula:

$$TD = DT \text{ células infectadas} / DT \text{ células controle}$$

4.5 Ensaio clonogênico

Com a finalidade de testar a capacidade de sobrevivência e da proliferação das células após infecção com os diferentes micro-organismos, foi realizado o ensaio clonogênico (FRANKEN; RODERMOND; STAP; HAVEMAN *et al.*, 2006). Desta maneira, foram plaqueadas 100 células SiHa, HeLa e PHK em placas de 60 mm e cultivadas em meio D10 (DMEM suplementado com 10% de SFB), a 37°C, 5% CO₂. Após 12 horas, foi realizada a inoculação com *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*, todos em MOI 30. As células foram monitoradas 15 dias. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, adicionando-se apenas o meio de cultura sem os micro-organismos. Após 15 dias, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com formaldeído 10% por 10 minutos e lavadas uma vez com água. Em seguida, as células foram coradas com 1 mL de solução de cristal violeta (0,1% de cristal violeta; 2% etanol absoluto) por 3 minutos. Após a coloração, as placas foram submersas em dois recipientes contendo água limpa e colocadas para secar à temperatura ambiente. As placas foram fotografadas e as colônias contadas.

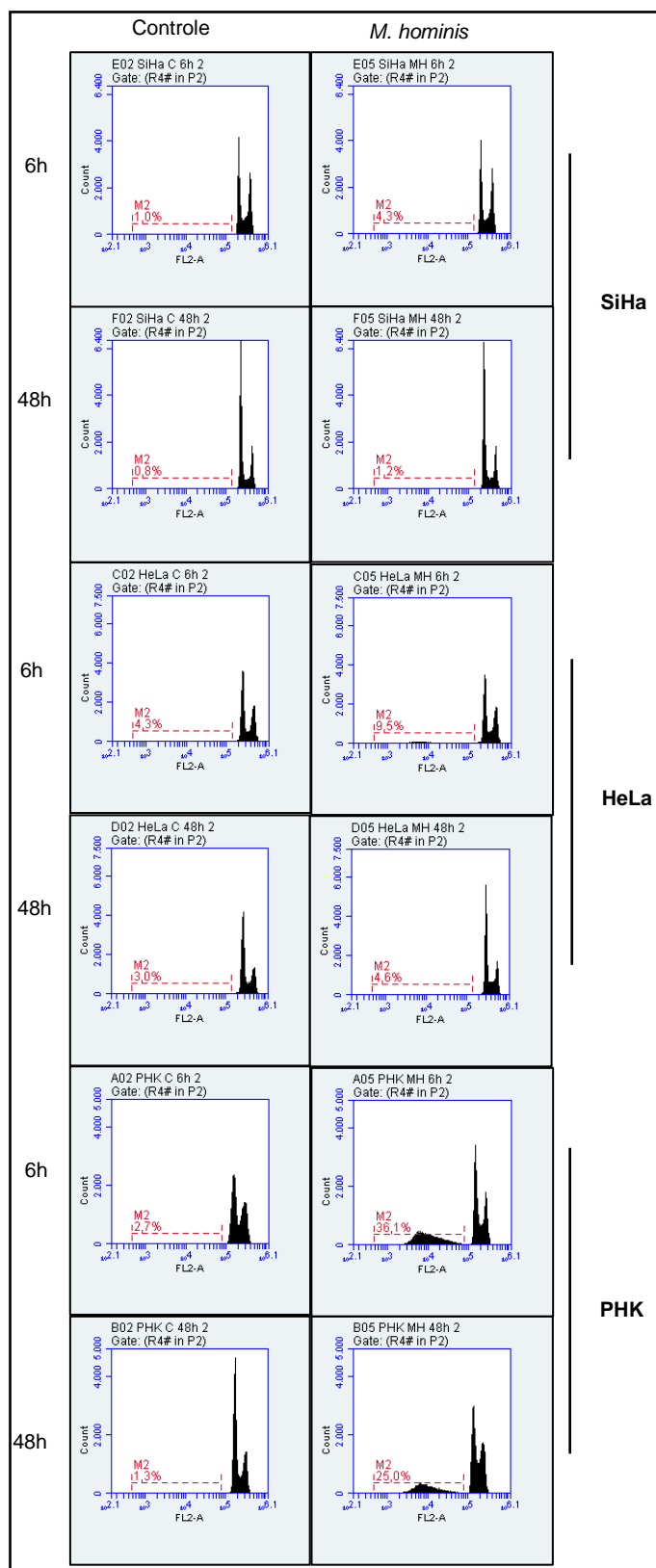
4.6 Análise de conteúdo Sub-G0/G1 e do ciclo celular por citometria de fluxo

A partir dos resultados da dose infectante, curva de crescimento celular e ensaio clonogênico, foi estabelecido que *M. hominis* apresentou alterações mais significativas nas linhagens celulares. Desta maneira, os ensaios de ciclo celular e população em Sub-G0/G1, proteínas envolvidas com apoptose, citocinas e expressão gênica foram realizados utilizando apenas este micro-organismo.

Com o intuito de determinar o conteúdo de DNA na fase Sub-G0/G1 bem como alterações nas populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular após infecção por *M. hominis*, as células foram submetidas à coloração com iodeto de propídio (PI) e, em seguida, analisadas por

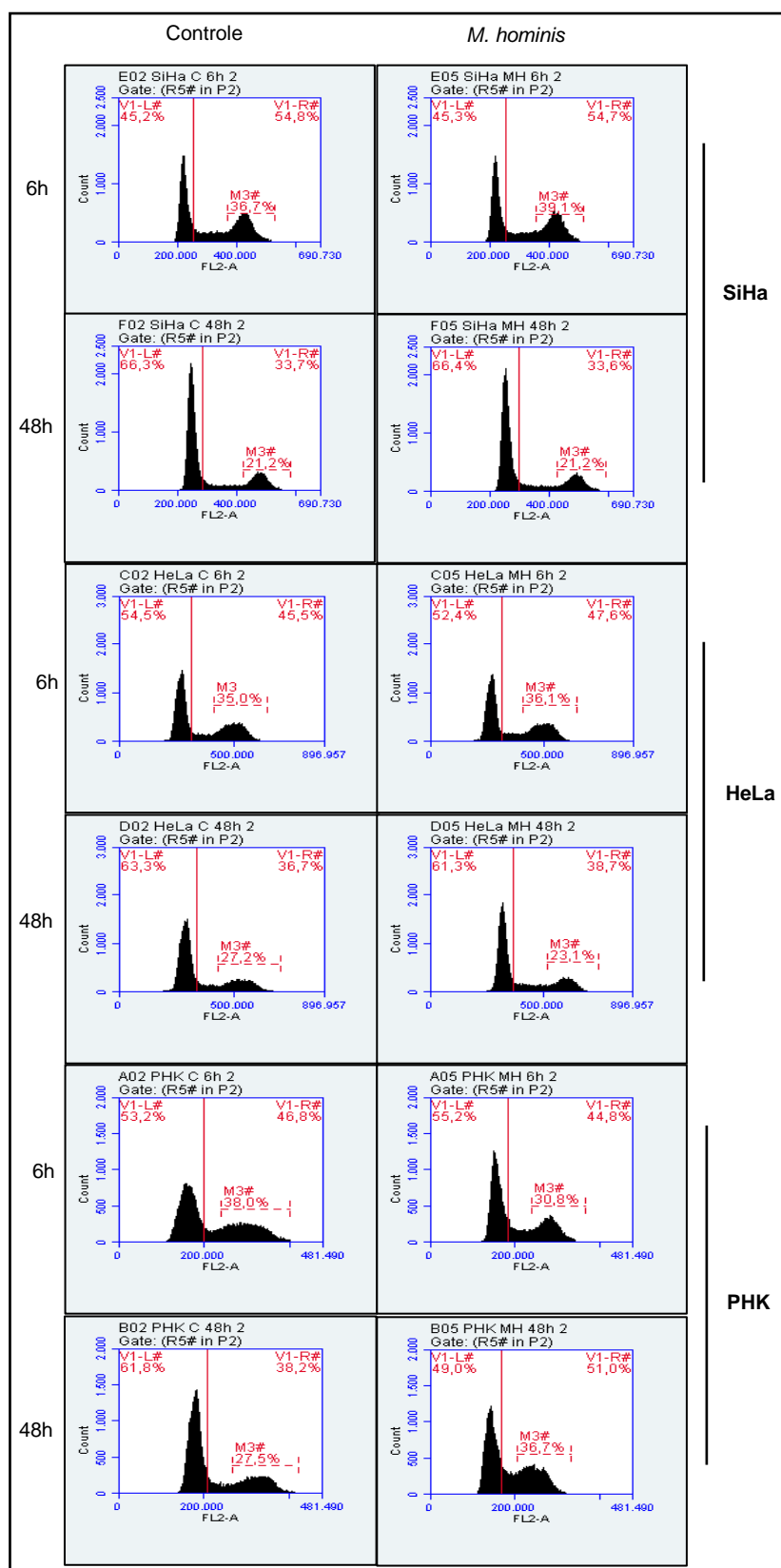
citometria de fluxo, seguindo protocolo descrito por Quinet et al., (2014), com modificações (QUINET; VESSONI; ROCHA; GOTTIFREDI *et al.*, 2014). O iodeto de propídio (PI) é um análogo do brometo de etídio, ou seja, um agente capaz de se intercalar entre as bases do DNA. Logo, a fluorescência deste agente corresponde à quantidade de DNA na célula. Para isso, 150.000 células PHK, HeLa e SiHa foram infectadas com *M. hominis* e as células foram incubadas à 37 °C durante 4h e 48 h. Após esse período, as células foram tripsinizadas e centrifugadas junto com seus respectivos sobrenadantes a 1500-2000g por 5 minutos. O sedimento celular foi fixado com etanol 70% gelado e armazenado à -20 °C por, no mínimo, 24h. As amostras foram lavadas com tampão PBS 1x, centrifugadas (1500 g, 5min) e o pellet (conteúdo de DNA) foi ressuspenso com a solução de iodeto de propídio ~200 uL (PI – 20 µg/mL, 200 µg/mL de RNase A, 0,1% de Triton x-100) e incubado por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com PBS 1x novamente, centrifugadas (4000 g, 3min) e homogeneizadas com ~100-200uL de PBS 1x filtrado, dependendo do tamanho do pellet. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos e a fluorescência do PI foi analisada por citometria de fluxo (citômetro BD Accuri C6). Para cada amostra, cerca de 10.000-25.000 células foram analisadas, e a taxa de aquisição foi de 100 eventos / segundo para que fosse possível diferenciar “singlets” e “doublets”. Além disso, foi realizado citograma da fluorescência de PI versus FSC (FSC vs. PI) para excluir “debris” celulares. Os dados foram analisados com o auxílio do software BD Accuri C6. Os histogramas da fluorescência emitida foram analisados para detectar e quantificar a presença de células com DNA fragmentado (região Sub-G0/G1) (Figura 9), DNA normal (diploide – região G0/G1, antes da síntese de DNA), DNA em processo de duplicação (região S) e DNA duplicado (poliploide – região G2/M) (Figura 10).

Figura 9 – Histogramas obtidos a partir dos dados de citometria de fluxo para análise das células em fase Sub-G0/G1 do ciclo celular.



Legenda: Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo das células na fase Sub-G0/G1 do ciclo celular. Dados obtidos a partir da infecção por *M. hominis* utilizando MOI 0,01- 0,04 em $1,5 \times 10^5$ células SiHa, HeLa e PHK. As células foram coradas e quantificadas após 6 e 48 horas de infecção.

Figura 10 – Histogramas obtidos a partir dos dados de citometria de fluxo para análise das células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular.



Legenda: Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo das células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular. Dados obtidos a partir da infecção por *M. hominis* utilizando MOI 0,01- 0,04 em $1,5 \times 10^5$ células SiHa, HeLa e PHK. As células foram coradas e quantificadas após 6 e 48 horas de infecção.

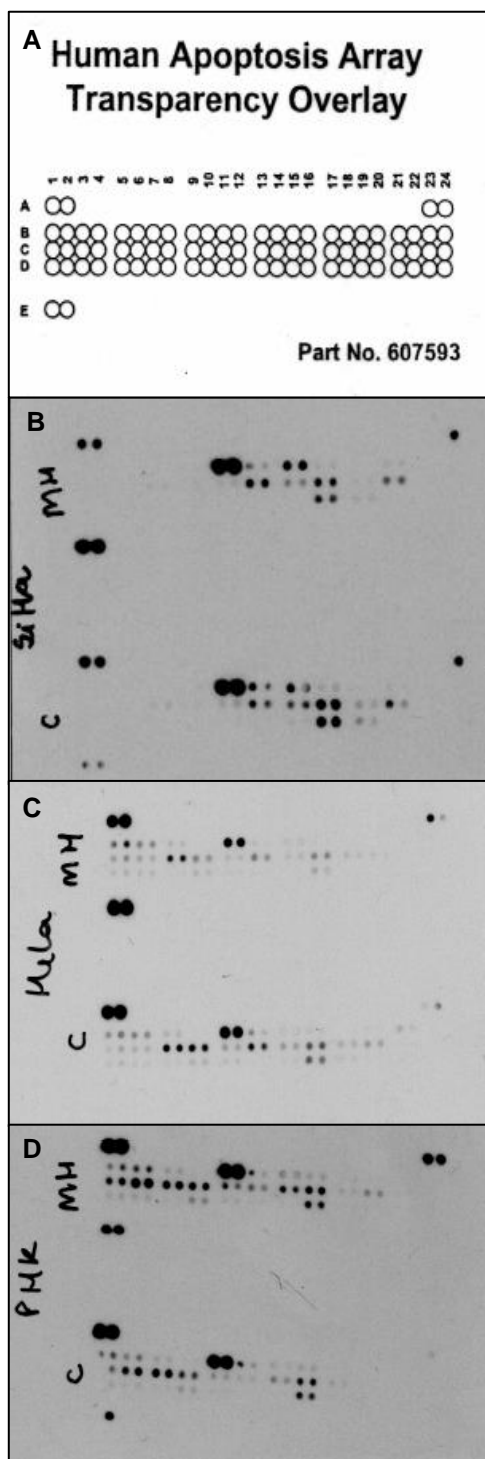
4.7 Obtenção de extratos proteicos

As células SiHa, HeLa e PHK após 4h e 48h de infecção por *M. hominis* foram lavadas com PBS pH 7,4 a 4 °C estéril, e mantidas em gelo durante a extração. Em seguida, conforme confluência das células, foram adicionados 400-1000 µL de tampão de lise fornecido pelo kit devidamente suplementados com inibidores de proteases (Complete Mini, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). As células foram removidas das placas utilizando um “cell scraper” estéril (Corning®, USA) e transferidas para microtubos, incubadas por 30 minutos entre 2-8°C e centrifugadas à 14000 g por 15 minutos à 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e então conservados a – 80 °C. A concentração proteica foi determinada pelo kit *Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies® USA) seguindo as instruções do fabricante.

4.8 Análise dos níveis de proteínas envolvidas na regulação/ativação da apoptose

Os níveis de proteínas que participam na regulação/ativação da apoptose foram determinados dos extratos proteicos totais de culturas de SiHa, HeLa e PHK utilizando o kit *Human Apoptosis Array* (Proteome Profiler, R&D Systems, Minneapolis, USA) após infecção por *M. hominis*. O kit *Human Apoptosis Array* (R&D Systems, Proteome Profiler™, Minneapolis, USA) possui anticorpos específicos para fatores envolvidos na regulação/ativação da apoptose fixados em membrana de nitrocelulose. Este kit permite detectar simultaneamente a expressão de 35 proteínas relacionadas a este processo (Quadro 1). Para isso, os extratos celulares foram devidamente quantificados, diluídos para 200 µg/1,5mL, distribuídos na membrana do kit e incubados sob agitação por 24 horas à temperatura de 4 °C, conforme instruções do fabricante. Após 24 horas a membrana foi lavada para remover as proteínas não ligadas. Finalmente a membrana foi exposta a uma solução mista de anticorpos de detecção biotinizados seguindo as instruções do fabricante, e submetidas à revelação utilizando filme fitográfico (Figura 11). Após a revelação os filmes foram escaneados e analisados pelo programa de quantificação de imagem ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Figura 11 – Representação das revelações das membranas de nitrocelulose do kit Human Apoptosis Array (Proteome Profiler, R&D Systems, Minneapolis, USA).



Legenda: A) figura esquemática para a representação do posicionamento das proteínas nas membranas de nitrocelulose do kit Human Apoptosis Array (Proteome Profiler, R&D Systems, Minneapolis, USA); B) imagem da revelação das membranas das células SiHa infectadas ou não com *M. hominis*; C) imagem da revelação das membranas das células HeLa infectadas ou não com *M. hominis*; D) imagem da revelação das membranas das células PHK infectadas ou não com *M. hominis*.

Quadro 1 – Lista de anticorpos primários presentes na membrana de nitrocelulose do kit Human Apoptosis Array (R&D Systems, Proteome Profiler™, Minneapolis, USA).

Bad	TRAIL R1/DR4	PON2
Bax	TRAIL R2/DR5	p21/CIP1/CDKN1A
Bcl-2	FADD	p27/Kip1
Bcl-x	Fas/TNFRSF6/CD95	Phospho-p53 (S15)
Pro-Caspase-3	HIF-1 alpha	Phospho-p53 (S46)
Cleaved Caspase-3	HO-1/HMOX1/HSP32	Phospho-p53 (S392)
Catalase	HO-2/HMOX2	Phospho-Rad17 (S635)
clAP-1	HSP27	SMAC/Diablo
clAP-2	HSP60	Survivin
Claspin	HSP70	TNF RI/TNFRSF1A
Clusterin	HTRA2/Omi	XIAP
Cytochrome c	Livin	

4.9 Quantificação das citocinas

Foi realizada a dosagem das citocinas liberadas no sobrenadante das culturas de células para o ensaio de “protein array” mencionado anteriormente. Assim, foi utilizando o kit comercial ProcartaPlex® Immunoassay Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh/Treg (18 plex) (eBioscience – Affmetrix, Estados Unidos) para determinação de GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e TNF- α . Esse kit baseia-se na metodologia para bioensaios multiplex–Luminex com equipamento Bio-Plex 200 system, que possibilitam a detecção e quantificação de múltiplos alvos de proteínas. O sistema xMAP® combina um citômetro de fluxo, microesferas fluorescentes, lasers e um processamento de sinal digital para permitir a multiplexação eficiente de até 100 ensaios exclusivos em uma única amostra. As dosagens das citocinas foram realizadas de acordo com o fabricante do kit utilizado. Para a normalização dos dados de citocinas, a quantidade obtida foi correlacionada com a quantidade de proteína total das células. A dosagem de proteínas totais foi realizada utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Brasil).

4.10 Expressão gênica RT-qPCR

4.10.1 Cultura de Células

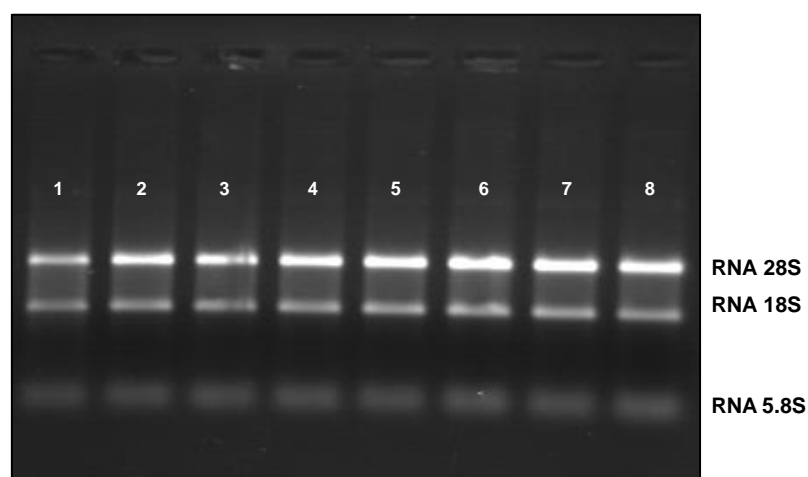
Para os ensaios de RT-qPCR array dos kits relacionados às vias dos receptores do tipo Toll e de dano ao DNA, foram utilizadas as linhagens de células PHK, HeLa e SiHa. Para a análise

da expressão das proteínas E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 foram utilizadas apenas as linhagens SiHa e HeLa. Foi realizada a infecção por *M. hominis* pelos períodos de 1, 4 e 48 horas, para avaliar a resposta celular nos momentos iniciais da infecção pelos *Mollicutes*, seguindo protocolo de Hopfe et al. (2013), com adaptações (HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER *et al.*, 2013). Todas as culturas celulares foram mantidas em condições padronizadas de 5% CO₂ a 37°C.

4.10.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

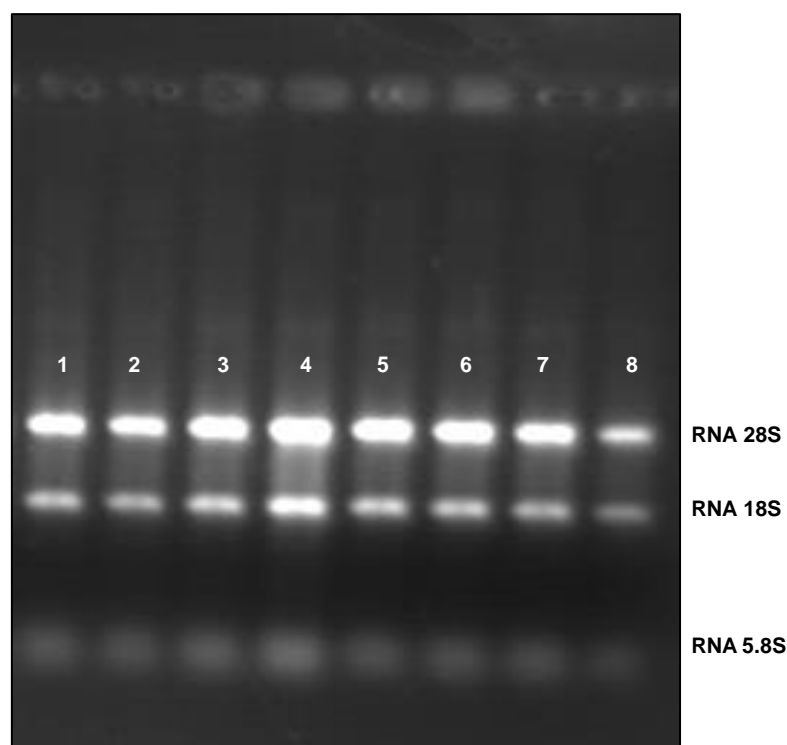
O RNA total foi extraído por meio da aplicação direta de 3mL de TRIzol (Invitrogen) por placa confluenta da cultura celular, transferido para tubos de 1,7mL e adicionado de 200µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por 15 segundos (vórtex), incubados por 5 minutos e centrifugados a 14000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 500 µL de Isopropanol, homogeneizado e acondicionado à -80°C pelo período mínimo de 16 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14000 g por 15 minutos a 4°C e o RNA precipitado lavado três vezes com etanol 75% a 4°C (preparado com água ultrapura livre de DNase/RNase) por meio de centrifugações de 15 minutos a 14000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado, os tubos com o sedimento foram invertidos para eliminar o excesso de etanol e o RNA ressuspenso em 100 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase. As amostras foram tratadas com RQ1 RNase-free DNase® (PROMEGA, Wisconsin, EUA) e quantificadas por sua densidade óptica a 260 nm. A pureza e qualidade da solução foram atestadas pelas razões 260/280nm e 260/230 nm medidas no NanoDrop2000® (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (500ng de RNA por amostra), conforme pode ser observado em alguns exemplos representados nas Figuras 12 e 13. Baseado no menor valor de massa total entre todas as amostras, 550 ng de RNA foi submetido à transcrição reversa utilizando SuperScript™ III (*Life Technologies*, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante, para avaliação da expressão dos genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18. Para a obtenção do cDNA utilizado nas reações de RT-qPCR dos kits RT² Profiler PCR Human Toll-like Receptor Signaling Pathway e RT² Profiler PCR Array Human DNA damage, foi utilizado o kit RT² First Strand (Qiagen, Germany) seguindo as instruções do fabricante, utilizando a concentração de 0,5 µg de RNA para cada amostra.

Figura 12 – Representação da integridade do RNA após extração.



Legenda: eletroforese em gel de agarose a 0,8% (500 ng de RNA por amostra) 1 - SiHa controle 4h – amostra 1; 2 - SiHa controle 4h – amostra 2; 3 - SiHa *M. hominis* 4h – amostra 1; 4 - SiHa *M. hominis* 4h – amostra 2; 5 - SiHa controle 48h – amostra 1; 6 - SiHa controle 48h – amostra 2; 7 - SiHa *M. hominis* 48h – amostra 1; 8 - SiHa *M. hominis* 48H – amostra 2.

Figura 13 – Representação da integridade do RNA de células HeLa após extração.



Legenda: eletroforese em gel de agarose a 0,8% (500 ng de RNA por amostra) 1 - HeLa controle 4h – amostra 1; 2 - HeLa controle 4h – amostra 2; 3 - HeLa *M. hominis* 4h – amostra 1; 4 - HeLa *M. hominis* 4H – amostra 2; 5 - HeLa controle 48h – amostra 1; 6 - HeLa controle 48h – amostra 2; 7 - HeLa *M. hominis* 48h – amostra 1; 8 - HeLa *M. hominis* 48H – amostra 2.

Devido a possibilidade de contaminação com DNA genômico, anteriormente à etapa de transcrição reversa, as amostras foram submetidas à reação de PCR com o gene da tubulina que gera um produto de 241 pb (Quadro 2). As reações foram realizadas com volume final de 25 µL contendo a concentração final de 1x *TaqGold PCR Buffer*® (*Applied Biosystems*, Texas, USA), 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 U de *AmpliTaqGold* DNA polimerase (*Applied Biosystems*, Texas, USA) e 100 nM de cada iniciador no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Texas, USA). Cada ciclo incluiu 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de anelamento a 60 °C e 1 minuto para o alongamento a 72 °C. O primeiro ciclo foi precedido por 5 minutos de desnaturação a 95 °C e o último ciclo estendido por 7 minutos de alongamento a 72 °C.

4.10.3 Expressão de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 em células SiHa e HeLa

4.11.3.1 Desenho dos primers e padronização da reação

Foram desenhados primers específicos para os genes E6 e E7 dos HPVs 16 e 18 de acordo com as regiões genômicas obtidas em <https://pave.niaid.nih.gov/>. Os primers utilizados estão descritos no Quadro 2.

As reações de qPCR foram realizadas com a utilização do reagente SYBR Green® (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA) em plataforma que contém o termociclador acoplado ao sistema ótico para excitação e captação da fluorescência - *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA). Todas as reações foram realizadas em triplicata utilizando 2 µL do cDNA diluído 1:40 em volume total de 12,5 µL. A padronização dos ensaios de qPCR foi realizada com diferentes concentrações de primers sendo que a menor a atingir o menor Ct foi selecionada. A concentração de primer ótima para todas as reações foi de 150 nM. O protocolo para amplificação foi realizado pelo ciclo inicial de 95°C para ativação da polimerase por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e depois a 60°C por 60 segundos.

Quadro 2 – Relação dos primers utilizados para controle da transcrição reversa e para a análise de expressão dos genes E6 e E7 dos HPV 16 e HPV 18.

Primers	Sequências
HPV-16 E6-F	5'-ATGACTTTGCTTTTCGGGAT-3'
HPV-16 E6-R	5'-CTTTGCTTTTCTTCAGGACA -3'
HPV 16 E7- F	5'-AGAACCGGACAGAGCCCATTAC-3'
HPV 16 E7- R	5'-GCCCATTAACAGGTCTTCCAAAG-3'
HPV-18 E6-F	5'-GACAGTATTGGAAGTTACAGAGGTA-3'
HPV-18 E6-R	5'-CAGAGTCTGAATAATGTCTTAATTCTCTA-3'
HPV 18 E7- F	5'-ATGTCACGAGCAATTAAGC-3'
HPV 18 E7- R	5'-TTCTGGCTTCACACTTACAACA-3'
GAPDH-F	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'
GAPDH-R	5'-TTGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'
Tubulina-F	5'-TCAACACCTTCTTCAGTGAAACGR-3'
Tubulina-R	5'-AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'

4.10.3.2 Seleção de genes normalizadores

Para a normalização dos ensaios de qRT-PCR foram selecionados genes cuja expressão foi mais estável entre as duas linhagens celulares. O nível de expressão de 8 genes (GAPDH, ACTB, HMBS, TUBA, RPLO, RPL27, TBP e HPRT1) foi avaliado nas 2 linhagens celulares. O gene selecionado foi o GAPDH que não variou mais do que 0,5 Ct entre as amostras e que teve eficiência dentro da amplitude média não maior do que 5%.

4.10.3.3 Análise de Expressão Gênica

A quantificação relativa da expressão dos genes em questão foi realizada utilizando o método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Esse método baseia-se na redução dos valores de Cts da amostra controle em relação as amostras testadas. Os valores de todas as amostras foram normalizados por um gene controle ou normalizador.

4.10.4 Análise de expressão gênica: *Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway* e *Human DNA Damage Signaling Pathway*

O cDNA obtido foi submetido a análise pelos kits *Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway* e *Human DNA Damage Signaling Pathway* (Qiagen-SABioscience, Brasil). O kit *Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway* qPCR array permite analisar a expressão de 84 genes centrais para a transdução de sinal mediada por TLR e imunidade inata (Quadro 3). A família TLR de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) detecta ampla gama de bactérias, vírus, fungos e parasitas por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Cada

receptor liga-se especificamente a determinados PAMPs, e inicia a resposta imune inata para a classe específica de patógeno e ativa a resposta imune adaptativa. O kit *Human DNA Damage Signaling Pathway* qPCR array (Qiagen) analisa a expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA (Quadro 4). Os genes apresentados são aqueles associados à rede de sinalização ATR / ATM e aos alvos transcrpcionais da resposta a danos no DNA. Os danos no DNA podem resultar em parada do ciclo celular, apoptose e estabilização e reparo do genoma celular. Todos os procedimentos e análise de dados foram realizados de acordo com as instruções e software do fabricante.

Quadro 3 – Relação dos genes quantificados pelo kit *Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway* PAHS-018ZA (Qiagen).

Símbolo	Descrição
BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CD14	CD14 molecule
CD180	CD180 molecule
CD80	CD80 molecule
CD86	CD86 molecule
CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
ECSIT	ECSIT homolog (Drosophila)
EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
HMGB1	High mobility group box 1
HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A
HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
IFNA1	Interferon, alpha 1
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
IFNG	Interferon, gamma
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
IL10	Interleukin 10
IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
IL1A	Interleukin 1, alpha

IL1B	Interleukin 1, beta
IL2	Interleukin 2
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
CXCL8	Interleukin 8
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF1	Interferon regulatory factor 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
JUN	Jun proto-oncogene
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
LY86	Lymphocyte antigen 86
LY96	Lymphocyte antigen 96
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
MAP2K4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
MAPK8IP3	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NFKBIL1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1
NFRKB	Nuclear factor related to kappaB binding protein
NR2C2	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2
PELI1	Pellino homolog 1 (Drosophila)
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PRKRA	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
SARM1	Sterile alpha and TIR motif containing 1
SIGIRR	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
TAB1	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1
TBK1	TANK-binding kinase 1
TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR1	Toll-like receptor 1
TLR10	Toll-like receptor 10
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR3	Toll-like receptor 3

TLR4	Toll-like receptor 4
TLR5	Toll-like receptor 5
TLR6	Toll-like receptor 6
TLR7	Toll-like receptor 7
TLR8	Toll-like receptor 8
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TOLLIP	Toll interacting protein
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0

Quadro 4 – Relação dos genes quantificados pelo kit *Human DNA Damage Signaling Pathway PAHS-029ZA* (Qiagen).

Símbolo	Descrição
ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BAX	BCL2-associated X protein
BBC3	BCL2 binding component 3
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
CIB1	Calcium and integrin binding 1 (calmyrin)
CRY1	Cryptochrome 1 (photolyase-like)
CSNK2A2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide
DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa

DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
EXO1	Exonuclease 1
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
H2AFX	H2A histone family, member X
HUS1	HUS1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12
MBD4	Methyl-CpG binding domain protein 4
MCPH1	Microcephalin 1
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (<i>E. coli</i>)
MLH3	MutL homolog 3 (<i>E. coli</i>)
MPG	N-methylpurine-DNA glycosylase
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>E. coli</i>)
MSH3	MutS homolog 3 (<i>E. coli</i>)
NBN	Nibrin
NTHL1	Nth endonuclease III-like 1 (<i>E. coli</i>)
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (<i>S. cerevisiae</i>)
PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase
PPM1D	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
RAD1	RAD1 homolog (<i>S. pombe</i>)
RAD17	RAD17 homolog (<i>S. pombe</i>)
RAD18	RAD18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD21	RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>)
RAD50	RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD51	RAD51 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD51B	RAD51 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD9A	RAD9 homolog A (<i>S. pombe</i>)
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8
REV1	REV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)

RNF168	Ring finger protein 168
RNF8	Ring finger protein 8
RPA1	Replication protein A1, 70kDa
SIRT1	Sirtuin 1
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
TOPBP1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
TP53	Tumor protein p53
TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1
TP73	Tumor protein p73
UNG	Uracil-DNA glycosylase
XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3
XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0

4.11 Análise estatística

Para todos os ensaios, quando as análises foram realizadas entre dois grupos independentes, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney unicaudal, visto que as pré-suposições para utilização de um teste paramétrico não foram satisfeitas. Para os casos em que estes dois grupos eram dependentes, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon unicaudal. Nos casos em que a análise envolvia uma variável quantitativa e duas variáveis nominais foi utilizado Two-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni. Para todos os testes, a significância estatística foi considerada nos casos em que o valor de $p < 0,05$, adotando o nível de confiança de 95%.

As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 (*GraphPad Software*, San Diego California, USA), com exceção dos dados de expressão gênica, em que os dados foram gerados e analisados pelo software do kit (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>), sendo o programa *GraphPad* utilizado apenas para representação gráfica dos resultados.

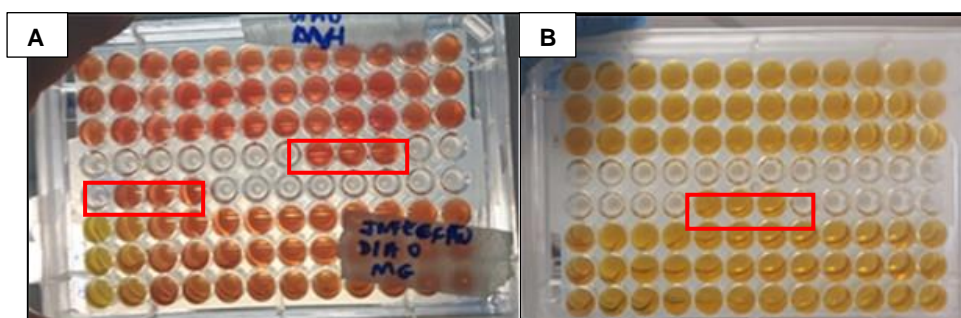
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do crescimento dos micro-organismos

Com a finalidade de padronizar a metodologia mais adequada para avaliar o crescimento dos micro-organismos para as infecções, foram realizados os ensaios de Unidade de Mudança Colorimétrica (CCU) e a contagem de colônias para estabelecer a Unidade Formadora de Colônia (UFC).

No presente estudo, a metodologia da CCU apresentou resultados desproporcionais às diluições e, em alguns casos, não houve mudanças na cor (Figura 14). Com relação à UFC, a contagem das colônias foi coerente com as diluições. Foi observado, principalmente para colônias de ureaplasmas, que o aumento da diluição favoreceu a contagem de colônias, tornando a contagem reprodutível. Desta maneira, a técnica de UFC foi escolhida para os ensaios posteriores.

Figura 14 – Quantificação de *Mollicutes* por CCU.

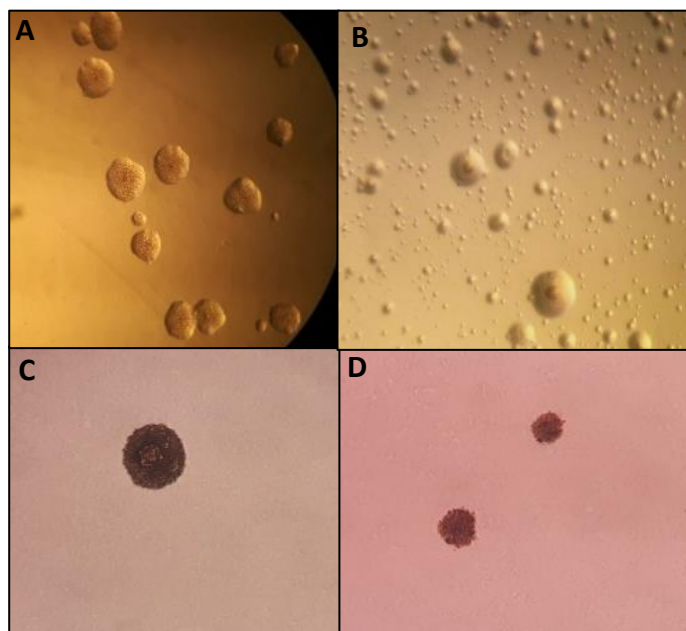


Legenda: Para a quantificação de mollicutes por meio da unidade de mudança colorimétrica (CCU), foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-12}) a partir de solução 10x concentrada de cada micro-organismo em microplacas de 96 poços, em triplicata. Após incubação, foi observado o crescimento de cada espécie por meio da mudança de cor do meio de cultura referente à cada diluição. A) 3 Linhas superiores: *M. hominis*, 3 linhas inferiores: *M. genitalium*. Quadros vermelhos em destaque: caldo SP4 estéril; B) 3 Linhas superiores: *U. parvum*, 3 linhas inferiores inferior: *U. urealyticum* Quadros vermelhos em destaque: caldo UB estéril. Quadros em destaque: controles negativos A) meio SP4; B) meio UB. Fonte: Amorim, AT. Laboratório de Micoplasmas – ICB/USP, 2017.

Na figura 15 apresentam-se as características morfológicas das colônias de *M. hominis* (Figura 15A), *M. genitalium* (Figura 15B), *U. urealyticum* (Figura 15C) e *U. parvum* (Figura 15D). Porém, como esperado, cada micro-organismo possui peculiaridades quanto ao seu crescimento, o que dificulta a padronização da dose aplicada para infecção das células, conforme será descrito a seguir. Apesar de produzir rapidamente colônias bastante evidentes (48-72 horas) o cultivo de *M. hominis* apresentou limitações na obtenção de inóculos maiores do que 10^5 UFC/mL. Como *M. genitalium* possui crescimento mais lento, as colônias se apresentavam pequenas e de difícil visualização e contagem; só se apresentavam favoráveis para a contagem de 20 a 30 dias de

crescimento em jarra de anaerobiose. Desta maneira, no ambiente úmido, ocorria o crescimento de fungos que dificultava o procedimento.

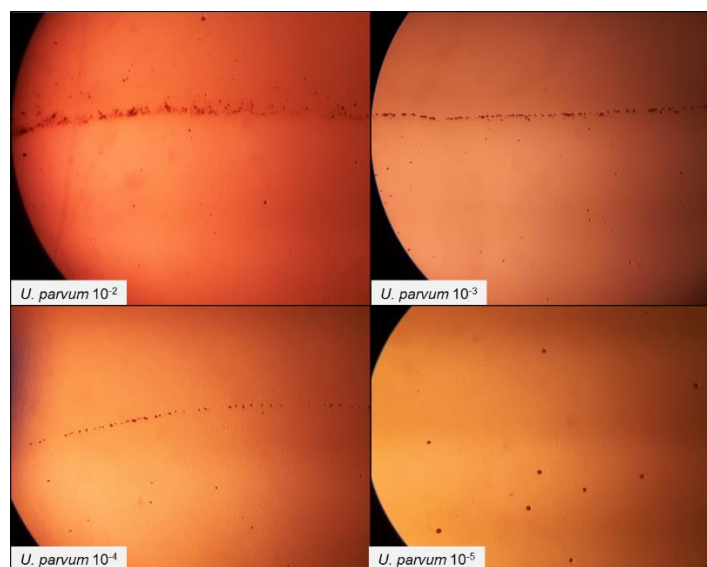
Figura 15 – Visualização de colônias de molícutes por microscopia óptica.



Legenda: Para a quantificação de molícutes por meio da unidade formadora de colônia (UFC), foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-12}) a partir de solução 10x concentrada. A partir de cada diluição, foi realizado o plaqueamento de 100 μ L em ágar SP4 ou UB, em triplicata. Após incubação, foi realizada contagem das colônias. A) Colônias de *M. hominis*, aumento 100x, diluição 10^{-3} , B) Colônias de *M. genitalium*, aumento 200x, diluição 10^{-1} , C) Colônia de *U. urealyticum*, aumento 200x, diluição 10^{-5} D) Colônias de *U. parvum*, aumento 200x, diluição 10^{-5} . Fonte: Amorim, AT. Laboratório de Mycoplasma – ICB/USP.

As espécies de ureaplasma apresentaram tempo de crescimento curto (8 horas), pois observava-se a rápida mudança de cor do caldo. Esta condição dificultava a obtenção de inóculo viável para as infecções. A mudança de pH do meio, paradoxalmente causa morte dos microorganismos (MASOVER; RAZIN; HAYFLICK, 1977; SMITH; RUSSELL; INGLEDEW; THIRKELL, 1993). Adicionalmente, a contagem de colônias era obtida das maiores diluições (10^{-5} e 10^{-6}) pois, se o inóculo estivesse muito concentrado, não seria possível observar colônias isoladas (Figura 16).

Figura 16 – Visualização de colônias de *U. parvum* por meio de microscópio estereoscópico (lupa).



Legenda: Para a quantificação, foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) a partir de solução 10x concentrada. A partir de cada diluição, foi realizado o plaqueamento de 100 μ L em placas contendo ágar UB, em triplicata. Após incubação, foi realizada contagem das colônias. Fonte: Amorim, AT. Laboratório de Mycoplasma – ICB/USP.

Foram realizados ensaios preliminares para utilizar micoplasmas em cultivos frescos, ou seja, não congelados previamente, para não incompatibilizar a sua adaptação e desenvolvimento pós-infecção nas culturas celulares. Desta forma, para obtenção da dose infectante e curva de crescimento, foram utilizados os micro-organismos do cultivo (frescos, sem passar pelo congelamento). Entretanto, devido a peculiaridades presentes no crescimento dos *Mollicutes*, variações na quantidade de micro-organismos foram observadas entre os diferentes cultivos, conforme as UFC/mL obtidas de cada espécie apresentado no Quadro 5. Na tentativa de manter os inóculos padronizados, em cada etapa, desde o crescimento das bactérias até a inoculação nas linhagens celulares foram realizadas tentativas as mais reprodutíveis possíveis, para garantir a robustez da metodologia. Portanto, aplicaram-se condições iguais para o crescimento e processamento, tais como tempo de crescimento, pH do meio, condições de anaerobiose ou não, centrifugação, lavagens, fatores de diluição para infecções, entre outras, para minimizar variações. Entretanto, considerando que cada espécie de *Mollicutes* possui condições ideais de crescimento peculiares, o estabelecimento da dose infectante tornou-se desafiadora. Além disso, a aplicação desta metodologia tornou-se insustentável para os ensaios posteriores, principalmente para conciliar os tempos de crescimento dos micro-organismos e o tempo ideal de crescimento das

células. Havia linhagens celulares com crescimento adequado, mas não os micro-organismos, ou vice-versa. Em adição, houve limitação em utilizar doses desconhecidas do micro-organismos nas infecções. Dessa forma, foi escolhido utilizar os micro-organismos congelados e com as quantificações já estabelecidas antes do congelamento. O descongelamento da cepa foi realizado no momento da infecção, aquecendo-se rapidamente o tubo em banho-maria à 37°C. Os micro-organismos foram quantificados novamente após cada descongelamento de alíquota para estabelecer o padrão de perda. Devido às limitações, as multiplicidades de infecção (MOI) utilizadas para os ensaios posteriores foi estabelecido entre 10 a 30 micro-organismos por célula.

5.2 Dose infectante

Para determinar a quantidade mínima de micro-organismos capaz de causar alterações no crescimento das linhagens celulares, foram realizadas infecções com quatro doses de cada micro-organismo. Houve variações na determinação da quantidade de micro-organismos após cada período de crescimento. As infecções foram realizadas seguindo as de diluições de 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100 baseando-se nas suspensões de estoque (Quadro 5).

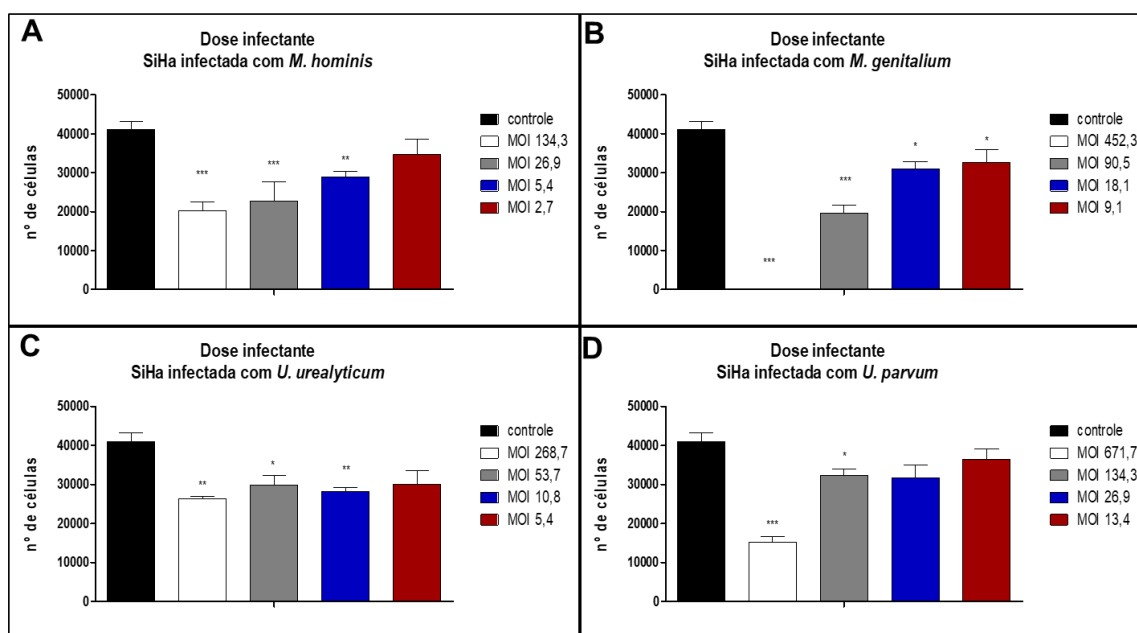
Quadro 5 – Concentração de micro-organismos nas suspensões de estoque para infecções em SiHa, HeLa e PHK para o ensaio de dose infectante.

Micro-organismos	Solução estoque para infecção em SiHa	Solução estoque para infecção em HeLa	Solução estoque para infecção em PHK
<i>M. hominis</i>	$3,0 \times 10^6$ UFC/mL	$3,5 \times 10^4$ UFC/mL	$4,0 \times 10^3$ UFC/mL
<i>M. genitalium</i>	$1,0 \times 10^7$ UFC/mL	$1,4 \times 10^8$ UFC/mL	$4,8 \times 10^5$ UFC/mL
<i>U. urealyticum</i>	$6,0 \times 10^6$ UFC/mL	$7,1 \times 10^6$ UFC/mL	$7,1 \times 10^6$ UFC/mL
<i>U. parvum</i>	$1,5 \times 10^7$ UFC/mL	$8,5 \times 10^8$ UFC/mL	$9,2 \times 10^7$ UFC/mL

Após infecção pelas quatro cepas de *Mollicutes*, as células SiHa apresentaram o menor número de células viáveis principalmente as infectadas com o MOI maior dos micro-organismos (*M. hominis* MOI 134,3, *M. genitalium* MOI 452,3, *U. urealyticum* MOI 268,7 e *U. parvum* MOI 671,7). As células não infectadas apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 17). O efeito é o mesmo com a segunda dose (*M. hominis* MOI 26,9, *M. genitalium* MOI 90,5, *U. urealyticum* MOI 53,7 e *U. parvum* MOI 134,3). Na terceira dose, houve diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *M. hominis* MOI 5,4, *M. genitalium* MOI 18,1 e *U. urealyticum* MOI 10,8 quando comparados ao grupo controle, mas não por *U. parvum* (MOI 26,9).

Na última dose, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre as células infectadas por *M. genitalium* apresentando o MOI de 9,1. Assim, verificou-se que *M. hominis*, *M. genitalium* e *U. urealyticum* foram capazes de causar alterações na viabilidade das células SiHa após 72 horas de infecção mesmo com menores MOI, e *U. parvum* apenas em concentrações mais elevadas.

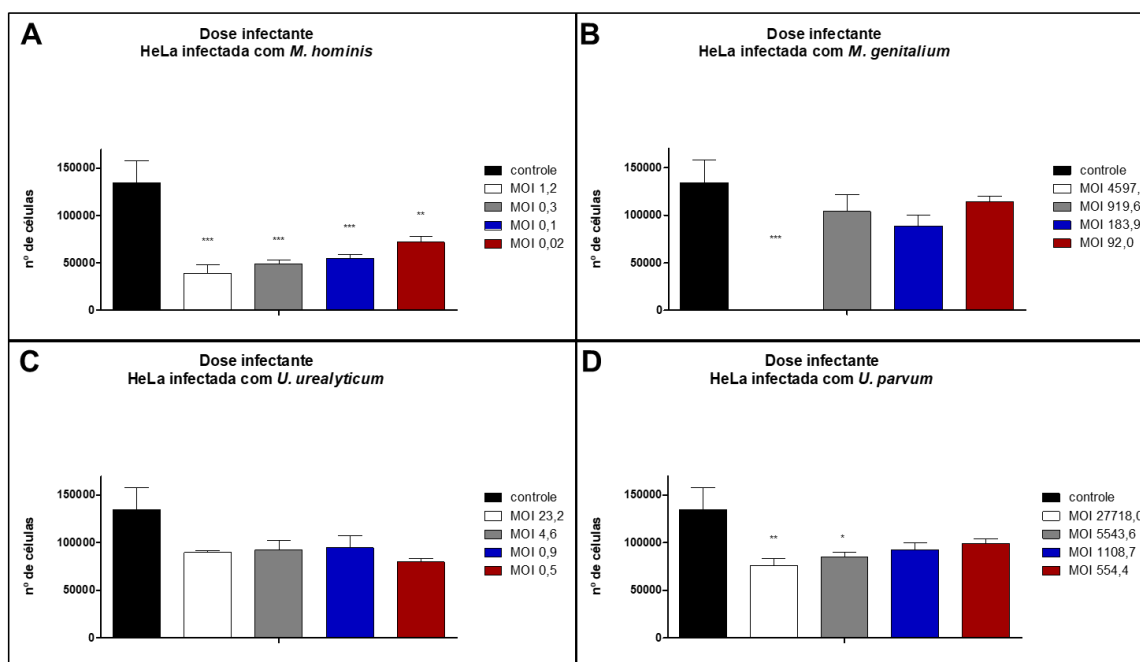
Figura 17 - Quantidade de células SiHa viáveis após 72h de infecção com diferentes concentrações de espécies de *Mollicutes*.



Legenda: Cada diluição utilizada para infecção (1:2; 1:10; 1:50 e 1:100) estava associada à quantidade de micro-organismo presentes nas suas respectivas soluções estoque, fornecendo MOI diferentes para cada cepa. Quantidade de células SiHa no momento da infecção ~11.166 células/poço. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados e o grupo controle.

Na análise das células HeLa (Figura 18), observou-se diminuição na quantificação das células infectadas com as diferentes doses de *M. hominis* (MOI 1,2, MOI 0,3, MOI 0,1 e MOI 0,02) comparado ao grupo controle. Para o grupo infectado com *M. genitalium* houve diminuição significativa apenas entre as células infectadas com a maior dose (MOI 45794,9). Não houve diminuição significativa entre as células infectadas com quaisquer doses de *U. urealyticum*. Para as células infectadas com *U. parvum*, houve diminuição na viabilidade das células infectadas com as duas doses mais concentradas (MOI 27718,0 e MOI 5543,6). Conclui-se que *M. hominis* apresentou maior capacidade de afetar a viabilidade das células HeLa mesmo com menores doses de inóculo. Os outros três mollicutes, ou não apresentaram efeito, ou apenas o fizeram em elevadas doses.

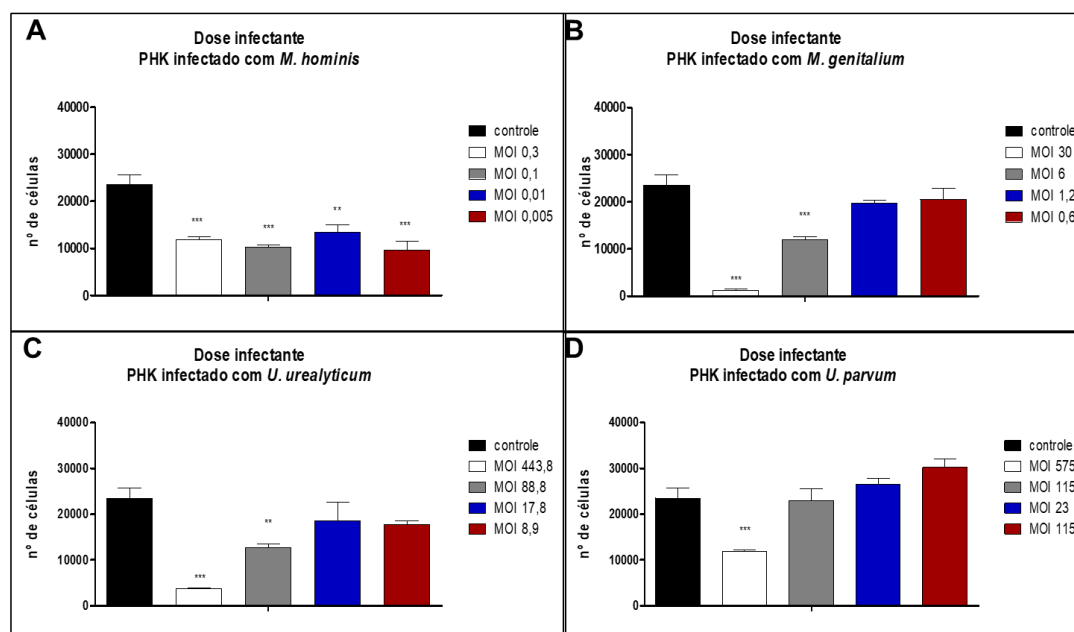
Figura 18 – Quantidade de células HeLa viáveis após 72h de infecção com diferentes concentrações de espécies de *Mollicutes*.



Legenda: Cada diluição utilizada para infecção (1:2; 1:10; 1:50 e 1:100) estava associada à quantidade de micro-organismo presentes nas respectivas suspensões estoque, fornecendo MOI diferentes para cada cepa. Quantidade de células HeLa no momento da infecção ~15.000 células/poço. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados e o grupo controle.

Houve diminuição significativa na viabilidade de células PHK infectadas com as doses de *M. hominis* (MOI 0,3, MOI 0,1, MOI 0,01 e MOI 0,005) (Figura 19). Para *M. genitalium*, houve diminuição da viabilidade das linhagens celulares infectadas com as duas doses mais concentradas (MOI 30 e MOI 6). Do mesmo modo, ocorreu com *U. urealyticum* (MOI 443,8 e MOI 88,8). Ao analisar *U. parvum*, observa-se que houve diminuição significativa da viabilidade apenas entre as células infectadas com a maior dose do micro-organismo (MOI 575). Conclui-se que *M. hominis* apresentou a capacidade de afetar a viabilidade de células PHK mesmo com concentrações de inóculos baixas, e as outras três espécies de mollicutes apenas o fizeram em doses mais concentradas.

Figura 19 – Quantidade de células PHK viáveis após 72h de infecção com diferentes concentrações de espécies de *Mollicutes*.



Legenda: Cada diluição utilizada para infecção (1:2; 1:10; 1:50 e 1:100) estava associada à quantidade de micro-organismo presentes nas respectivas suspensões estoque, fornecendo MOI diferentes para cada cepa. Quantidade de células PHK no momento da infecção ~8.000 células/poço. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados e o grupo controle.

Diante dos resultados encontrados no presente ensaio, verifica-se que as infecções por *M. hominis* foram capazes de diminuir a viabilidade de SiHa, HeLa e PHK mesmo em baixas concentrações de inóculo. Os outros micro-organismos causaram efeito semelhante apenas em concentrações mais elevadas.

5.3 Curvas de crescimento

Após observar o efeito da dose dos micro-organismos nas diferentes linhagens celulares, e devido as dificuldades encontradas para cultivo e estabelecimento das UFC/MI para cada espécie, foi estabelecido que para os ensaios de curva de crescimento seria utilizado para as infecções o fator de diluição 1:10 a partir da solução estoque (Quadro 6), ou seja, a segunda MOI mais concentrada de cada micro-organismo. Essa concentração foi escolhida ao invés daquela proveniente do inóculo mais concentrado (1:2), com o intuito de evitar a eliminação completa de algumas linhagens celulares, conforme observado anteriormente. Dessa forma, as MOIs foram calculadas para cada cepa e para cada linhagem celular, variando desde aproximadamente 1 (MOI mínima para *M. hominis*) até 6439 (MOI máxima para *U. parvum*), como pode ser visto no Quadro 6.

Quadro 6 – Relação das MOI utilizadas para as infecções das células SiHa, HeLa e PHK para realização das curvas de crescimento.

Micro-organismos		SiHa ~5062 células	HeLa ~7333 células	PHK ~3000 células	PHK pLXSN Ø ~3667 células	PHK pLXSN HPV 16 E6E7 ~2375 células
<i>M. hominis</i>	Solução estoque (UFC/mL)	~5,3x10 ⁴	~3,5x10 ⁴	~2,0x10 ³	~4x10 ³	~4x10 ³
	MOI	~0,6	~0,3	~0,04	~0,06	~0,1
<i>M. genitalium</i>	Solução estoque (UFC/mL)	~9,0x10 ³	~1,41x10 ⁸	4,8x10 ⁵	~1,6x10 ⁷	~4,8x10 ⁵
	MOI	~0,1	~1068	~9	~243	~12
<i>U. urealyticum</i>	Solução estoque (UFC/mL)	~2,13x10 ⁶	~7,1x10 ⁵	~6,0x10 ⁶	~3x10 ⁷	~7,1x10 ⁶
	MOI	~23	~6	~111	~455	~166
<i>U. parvum</i>	Solução estoque (UFC/mL)	~1,11x10 ⁶	~8,5x10 ⁸	~2,9x10 ⁸	~9,2x10 ⁷	~9,2x10 ⁷
	MOI	~220	~6439	~5365	~1394	~2152

Ao analisar os efeitos da infecção por *M. hominis* nas diferentes linhagens celulares (Figuras 20, 21 22 e 23), podemos observar que houve diminuição da quantidade de células SiHa (Figuras 20A e 21A) no grupo infectado por *M. hominis* logo após 48 horas, quando comparado com o grupo controle. Este efeito continuou até as 168 horas. Apesar da diminuição do número de células, foi observada uma diminuição da taxa de duplicação celular (0,8), reflexo da diminuição do tempo de duplicação celular (DT) que variou de aproximadamente 53h do grupo controle para 42h do grupo infectado, conforme pode ser visto no Quadro 7. Ao analisar as células HeLa (Figuras 20B e 21B), houve diminuição do número de células iniciando-se após 72 horas de infecção e se estendendo até as 168h. Ao analisar o DT, houve um discreto aumento da taxa de duplicação celular (1,1) (Quadro 7). Sobre a curva de crescimento de PHK (Figuras 22A e 23A), células não transformadas e não imortalizadas como SiHa e HeLa, observamos uma diminuição na proliferação das células infectadas com *M. hominis*, com diferença estatisticamente significativa a partir das 72h de infecção. Após esse período as células não recuperaram seu crescimento. Consequentemente, foi verificado um aumento no tempo de duplicação das células (173,5h) 9,4 vezes maior do que o grupo controle (18,5h) (Quadro 7). As células PHK pLXSN HPV 16 E6E7 e PHK pLXSN Ø sofreram um efeito significativo na viabilidade devido a infecção por *M. hominis*. Apresentaram diminuição da viabilidade das células após 96 horas em diante (Figuras 22B e C e 23B e C). O número diminuto de células nas contagens influenciou no DT 0,0 (zero).

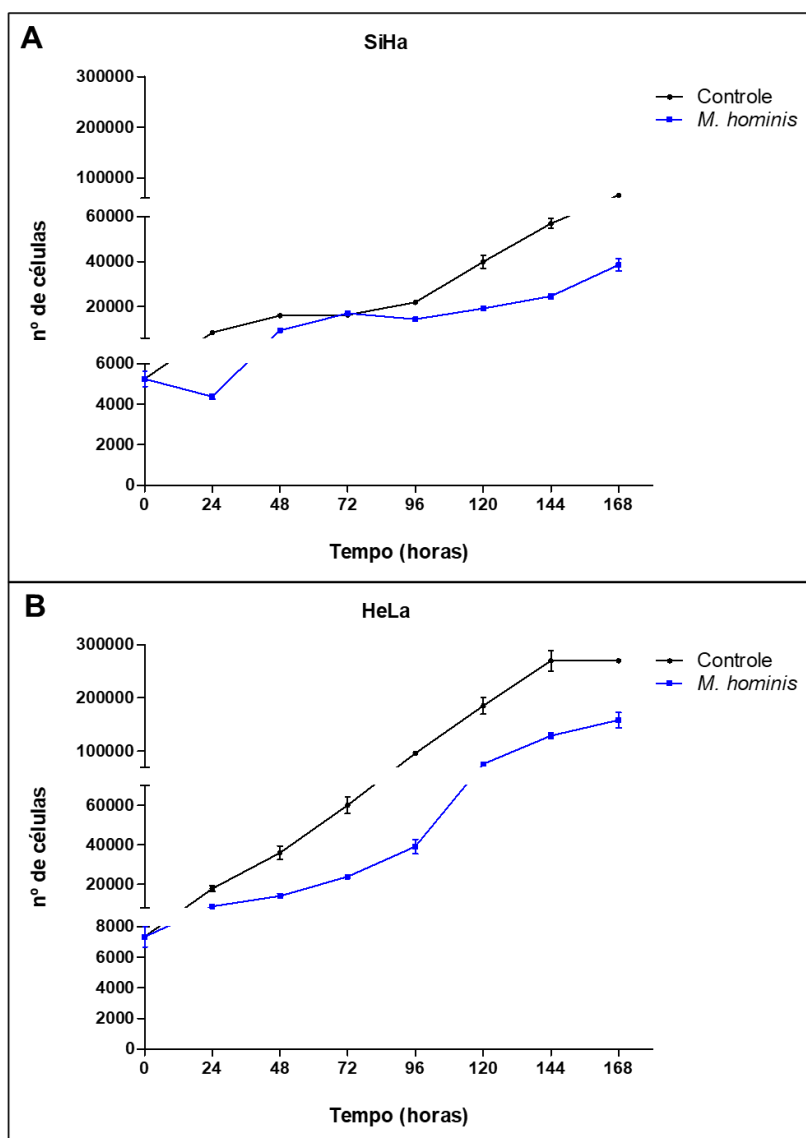
Quadro 7 – Doubling time (DT) das curvas de crescimento das células SiHa, HeLa, PHK, PHK pLXSN Ø e PHK pLXSN HPV 16 E6E7 infectadas com *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*.

Linhagens celulares	SiHa		HeLa		PHK		PHK pLXSN Ø		PHK pLXSN HPV 16 E6E7	
	DT ^a	Taxa de duplicação ^b	DT ^a	Taxa de duplicação ^b	DT ^a	Taxa de duplicação ^b	DT ^a	Taxa de duplicação ^b	DT ^a	Taxa de duplicação ^b
Controle	52,8	-	29,6	-	18,5	-	41,3	-	19,1	-
<i>M. hominis</i>	42,0	0,8	33,5	1,1	173,5	9,4	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>M. genitalium</i>	55,5	1,1	25,4	0,9	30,7	1,7	60,4	1,5	0,0	0,0
<i>U. urealyticum</i>	53,4	1,0	28,6	1,0	20,8	1,1	24,0	0,6	26,6	1,4
<i>U. parvum</i>	69,6	1,3	30,2	1,0	29,9	1,6	31,9	0,8	22,0	1,2

- a. Calculado utilizando fórmula $DT = (t2 - t1) \times \log(2) / (\log n2 - \log n1)$, sendo:
- t1: 24h após infecção e o
 - t2: 96 horas após a infecção pelos micro-organismos.
 - n1: média do número de células após 24 horas após a infecção pelos micro-organismos
 - n2: média do número de células após 96 horas após a infecção pelos micro-organismos

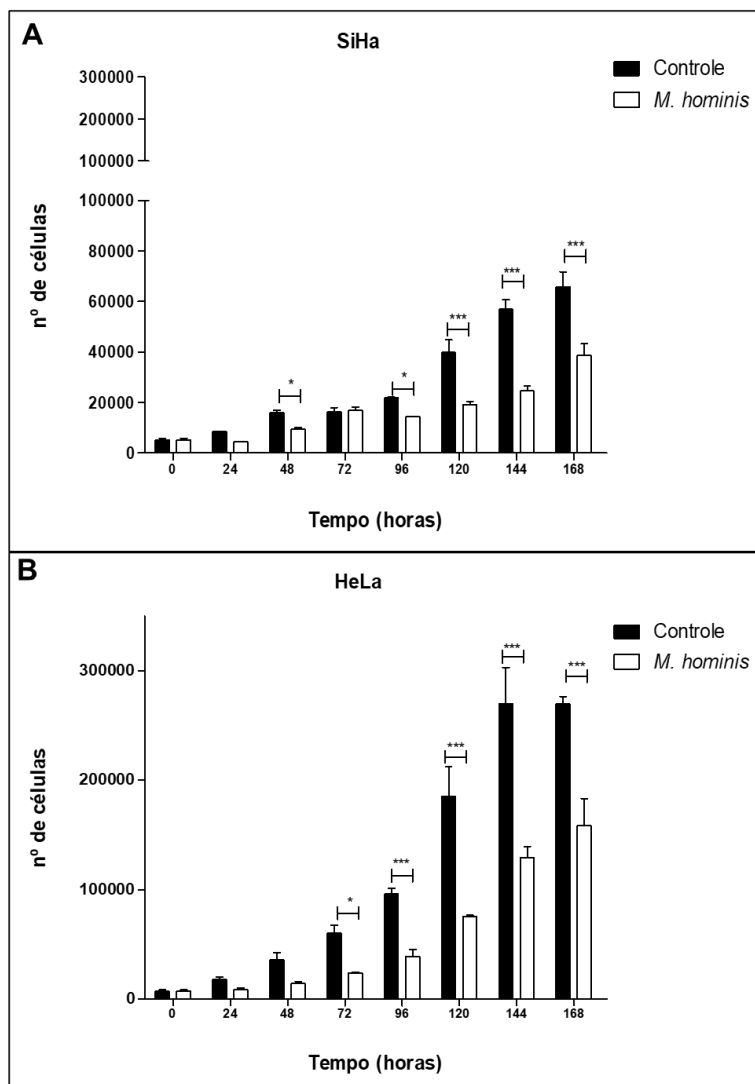
Taxa de duplicação = DT das células infectadas/ DT das células controle

Figura 20 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *M. hominis*.



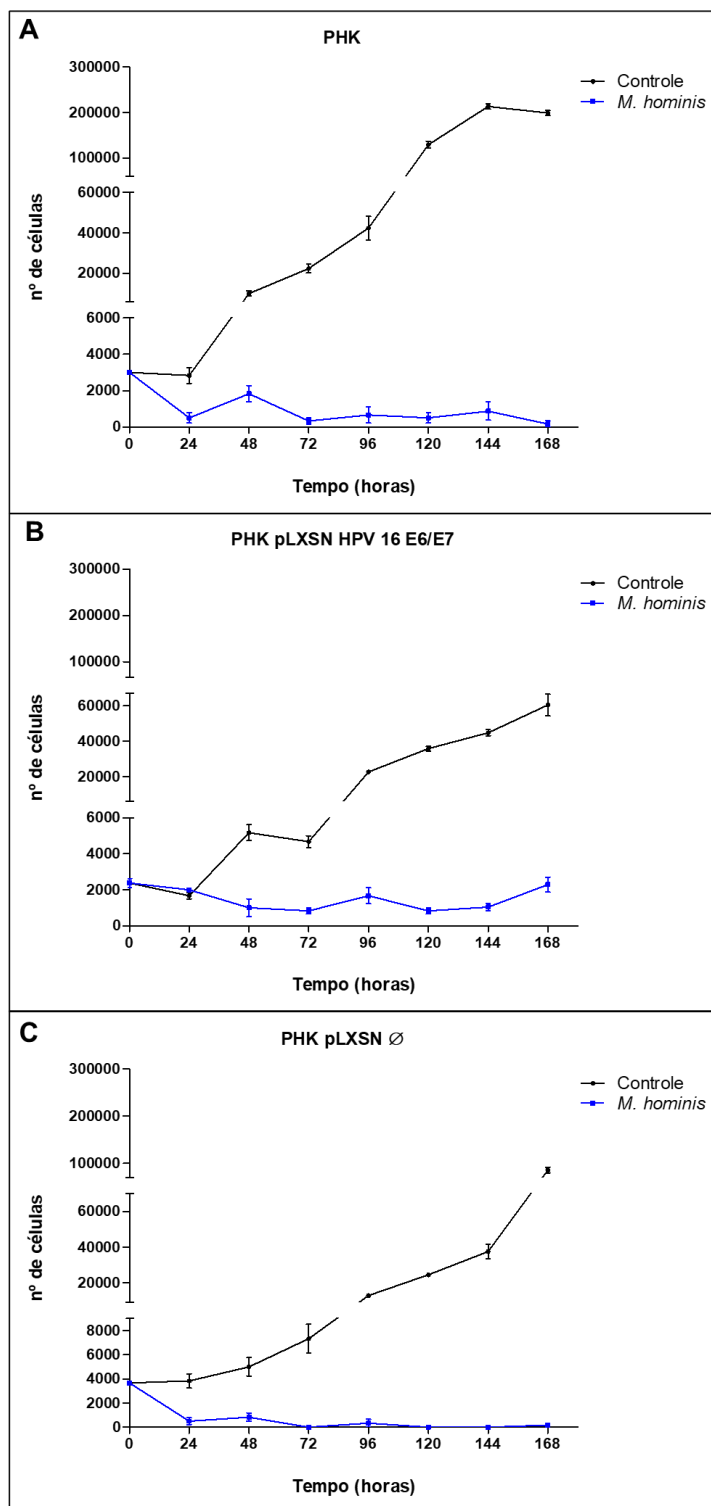
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3 - 7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. hominis* com MOI 0,04-0,6. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

Figura 21 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *M. hominis*.



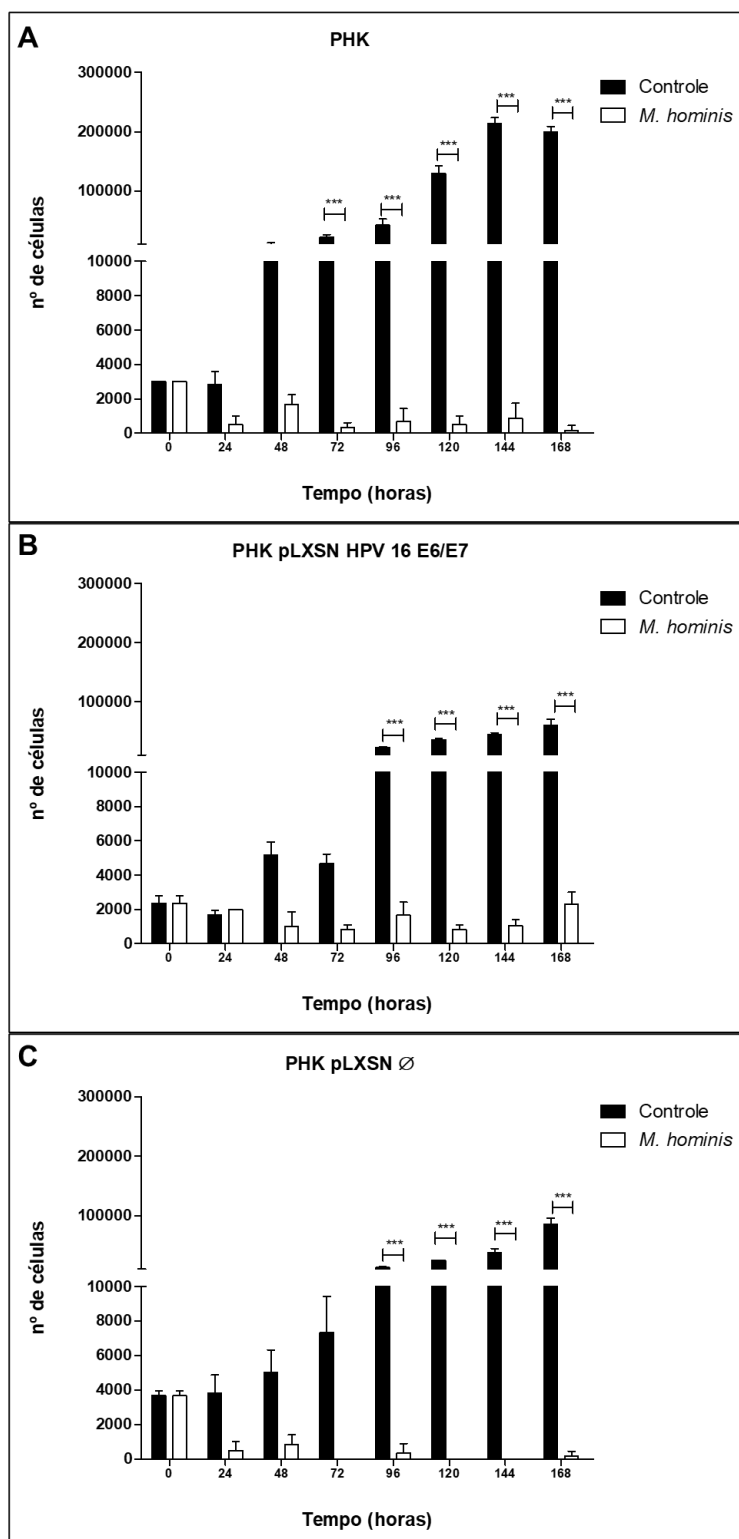
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3 - 7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. hominis* com MOI 0,04-0,6. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Figura 22 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 116 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *M. hominis*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. hominis* com MOI 0,04-0,6. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

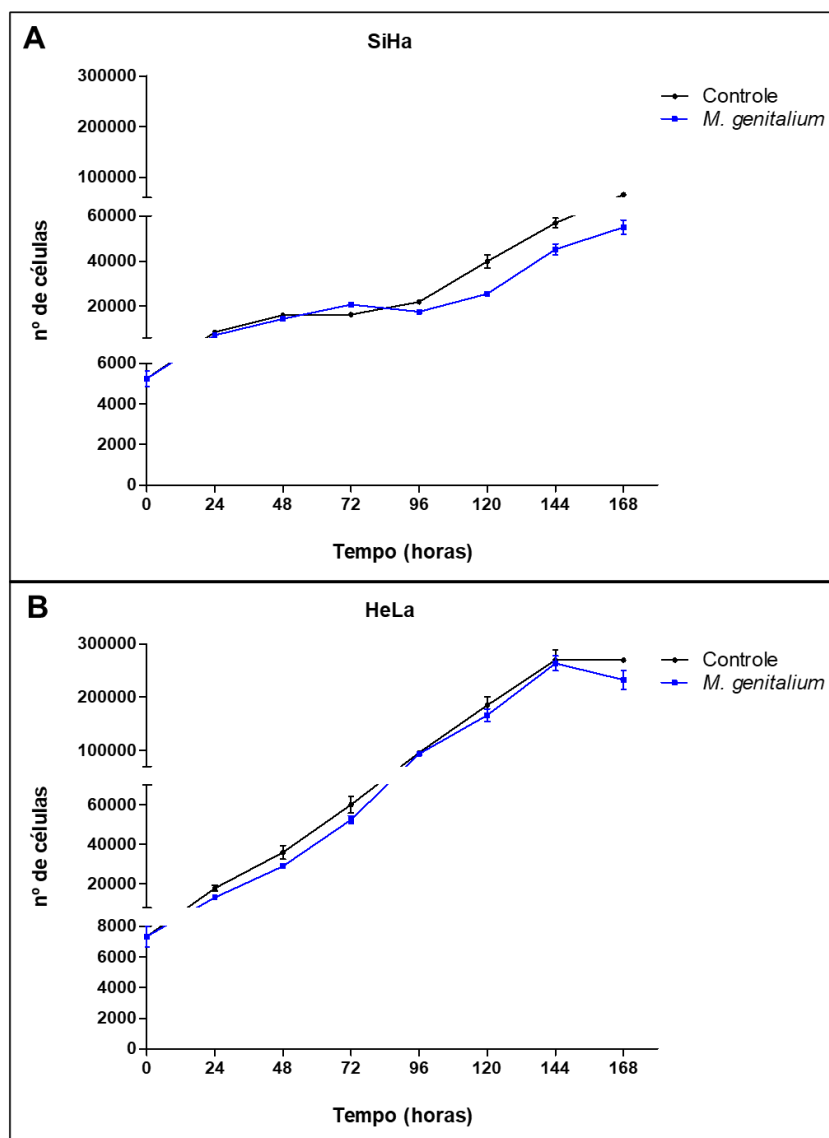
Figura 23 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 116 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *M. hominis*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3 - 3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. hominis* com MOI 0,04-0,6. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

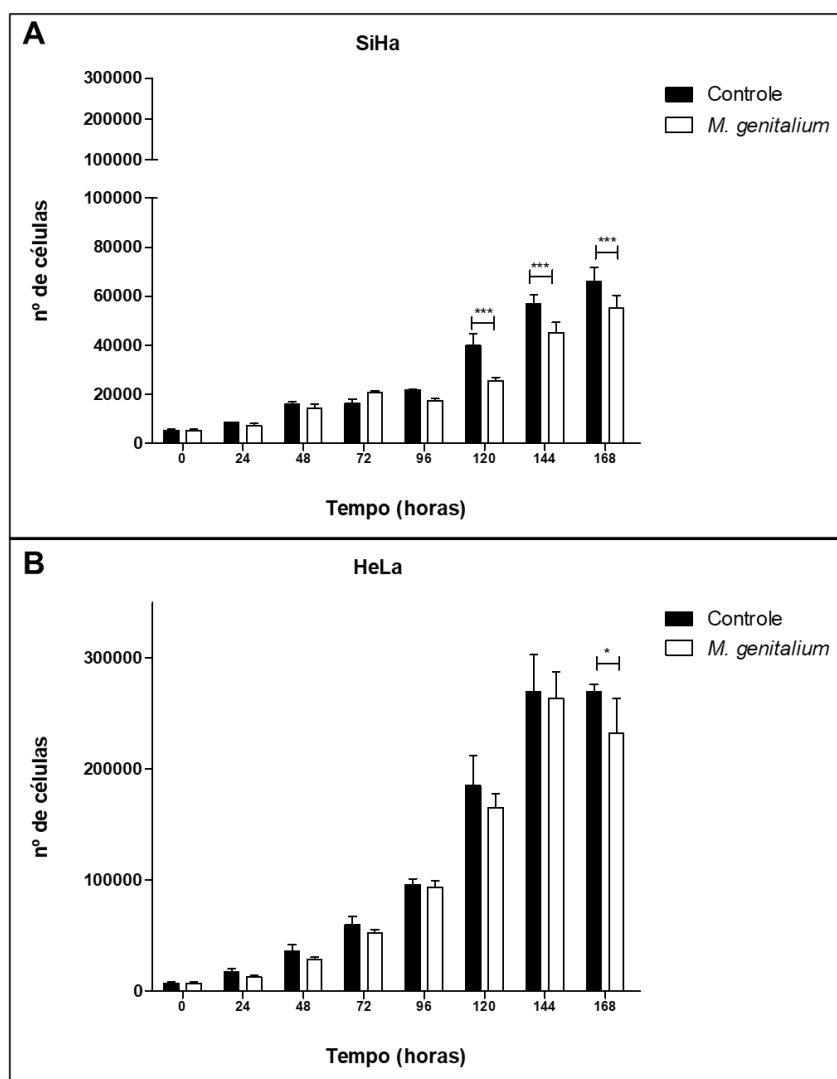
Ao verificar o efeito da infecção por *M. genitalium* em SiHa (Figuras 24A e 253A), observa-se diminuição na viabilidade celular apenas após 120 h em diante, com um discreto aumento no DT (55,5h) quando comparado com o controle (52,8h) e na taxa de duplicação (1,1). Em HeLa (Figuras 24B e 25B) houve diminuição significativa na quantidade de células apenas após 168h de infecção. A infecção pelo micro-organismo resultou na diminuição do DT (25,4h) quando comparado com o controle (29,6h), resultando numa discreta diminuição na taxa de duplicação (0,9) (Quadro 7). Com relação às três linhagens de queratinócitos (Figuras 26 e 27) a infecção por *M. genitalium* resultou na diminuição das células apenas a partir das 96h, resultando em elevação dos DTs (Quadro 7). Contudo, o efeito na viabilidade foi mais evidente nos queratinócitos transduzidos com pLXSN HPV 16 E6/E7, o que resultou em DT 0,0 (zero), ocasionado pela diminuta quantidade de células nos períodos escolhidos para as análises.

Figura 24 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *M. genitalium*.



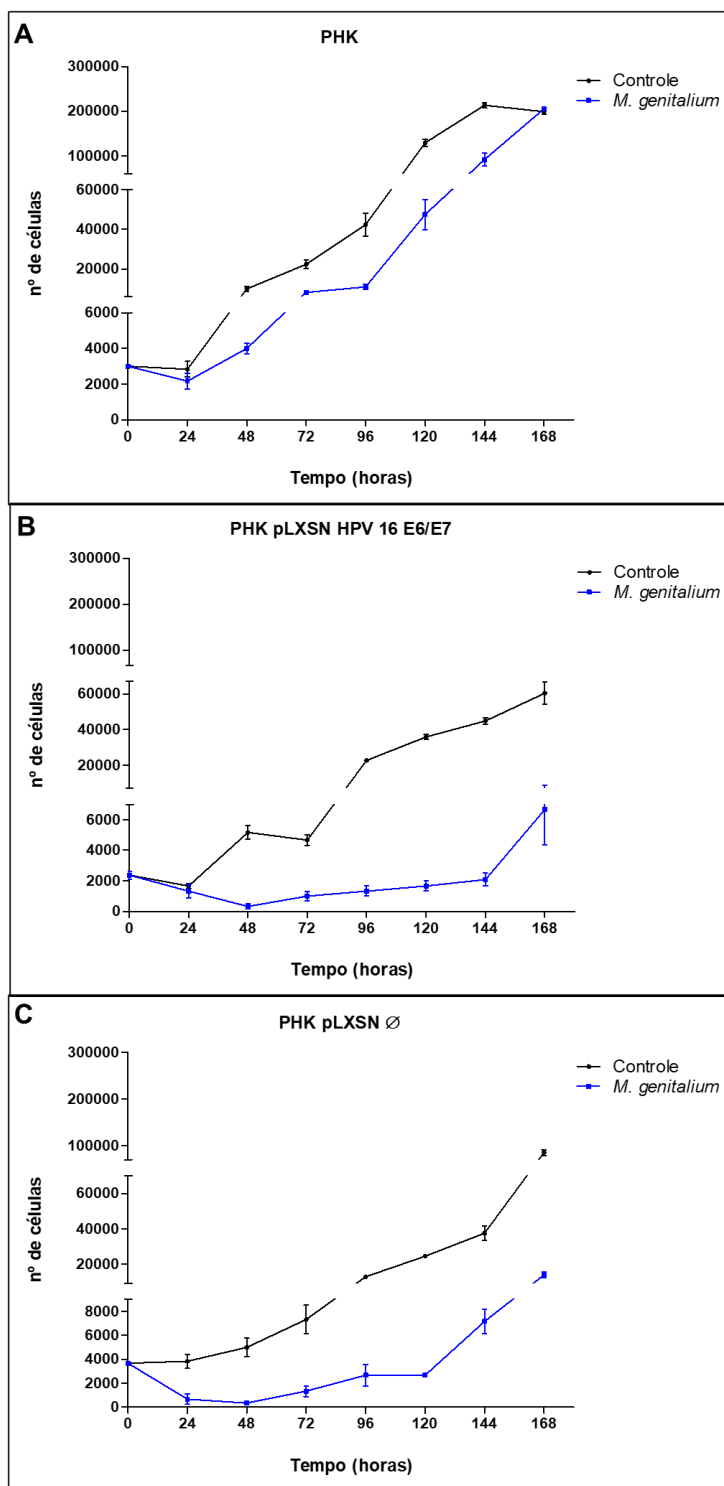
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3$ – $7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. genitalium* com MOI 1×10^{-1} – $1,1 \times 10^3$ 0,6. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

Figura 25 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *M. genitalium*.



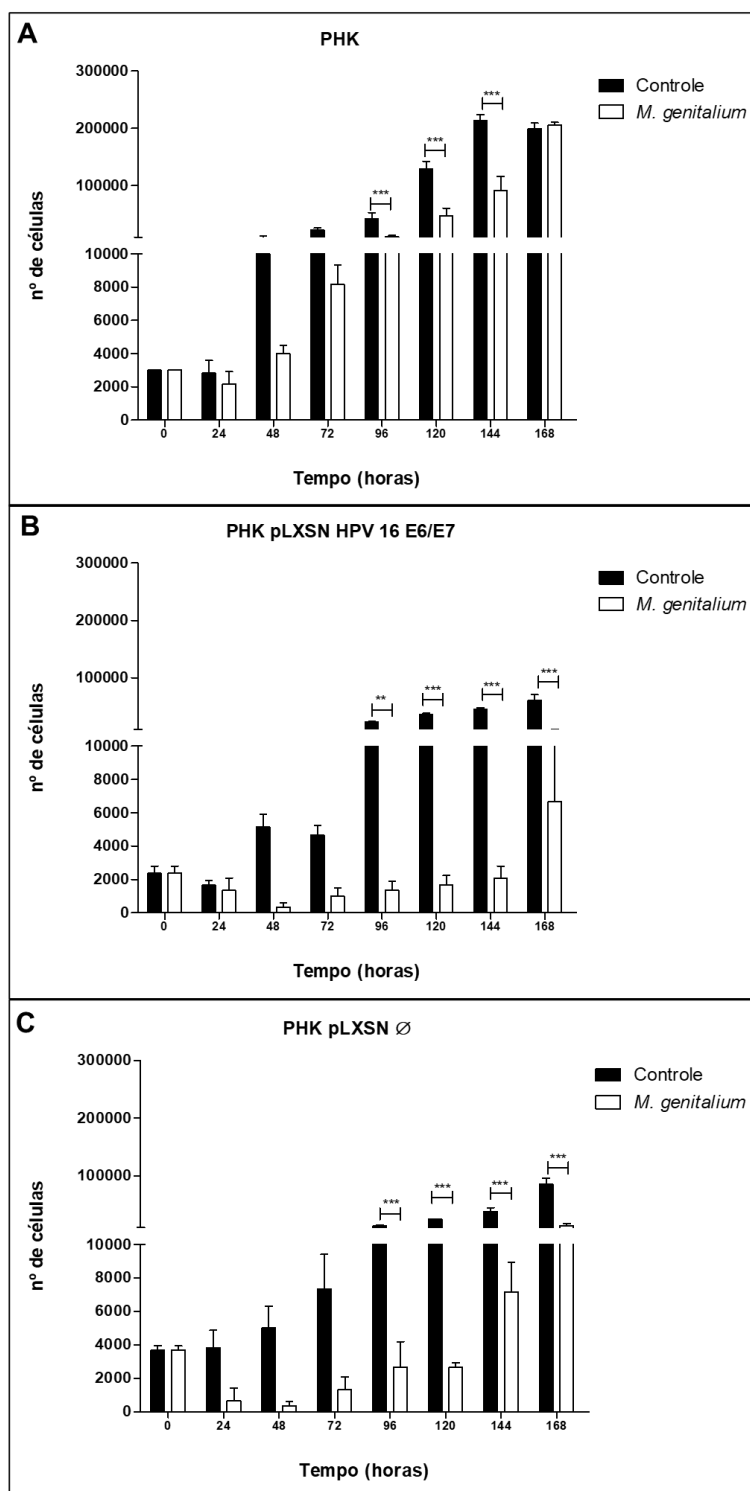
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3 - 7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. genitalium* com MOI $1 \times 10^{-1} - 1,1 \times 10^3$ 0,6. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Figura 26 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *M. genitalium*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. genitalium* com MOI 9 – $2,4 \times 10^2$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

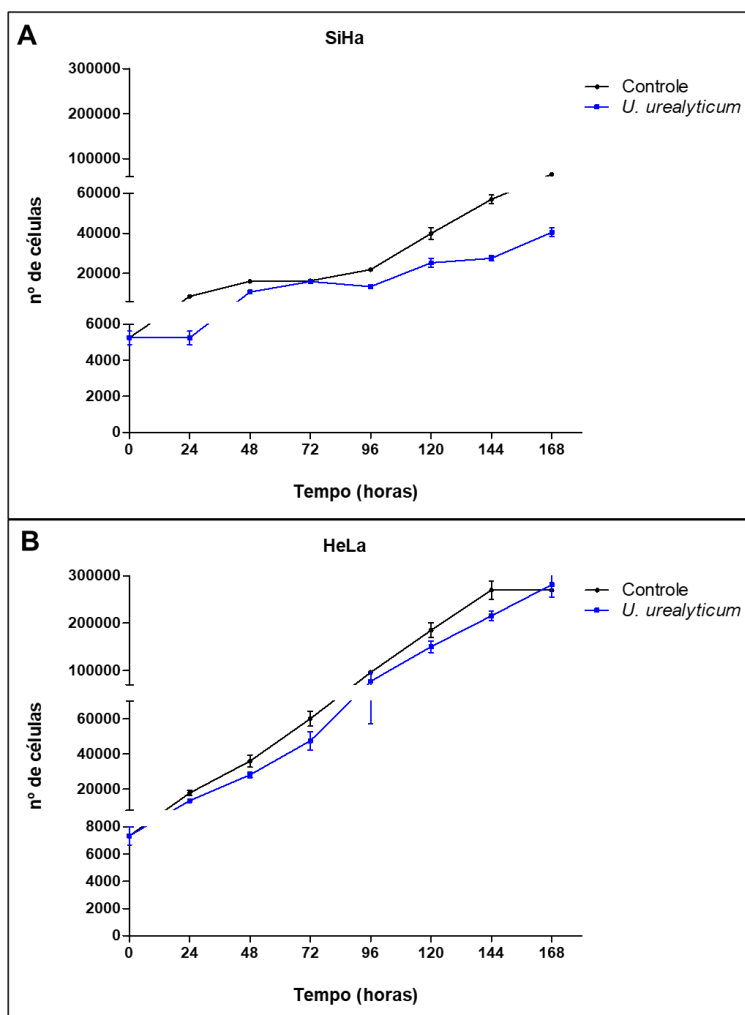
Figura 27 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *M. genitalium*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3 - 3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *M. genitalium* com MOI 9 – $2,4 \times 10^2$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

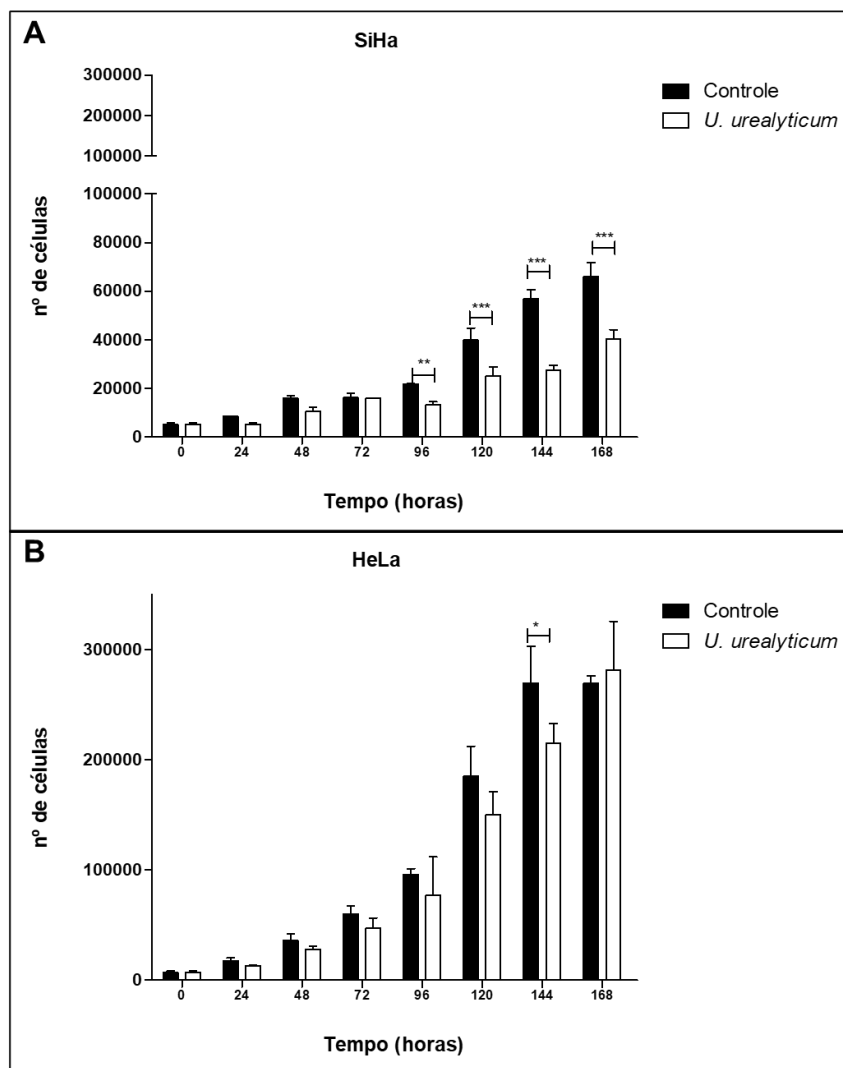
A infecção por *U. urealyticum* em SiHa resultou em alteração na viabilidade celular apenas após 96h em diante, e em HeLa apenas após 144h (Figuras 28 e 29), não afetando o DT e nem a taxa de duplicação das células nos períodos analisados (Quadro 7). Com relação aos queratinócitos (Figuras 30 e 31), houve diminuição do número de células viáveis mais tardiamente, apenas após 120h para as três linhagens após a infecção, com aumento nas taxas de duplicação para PHK (1,1) e PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 (1,4), e diminuição para pLXSN Ø (0,6) quando comparado com o controle.

Figura 28 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *U. urealyticum*.



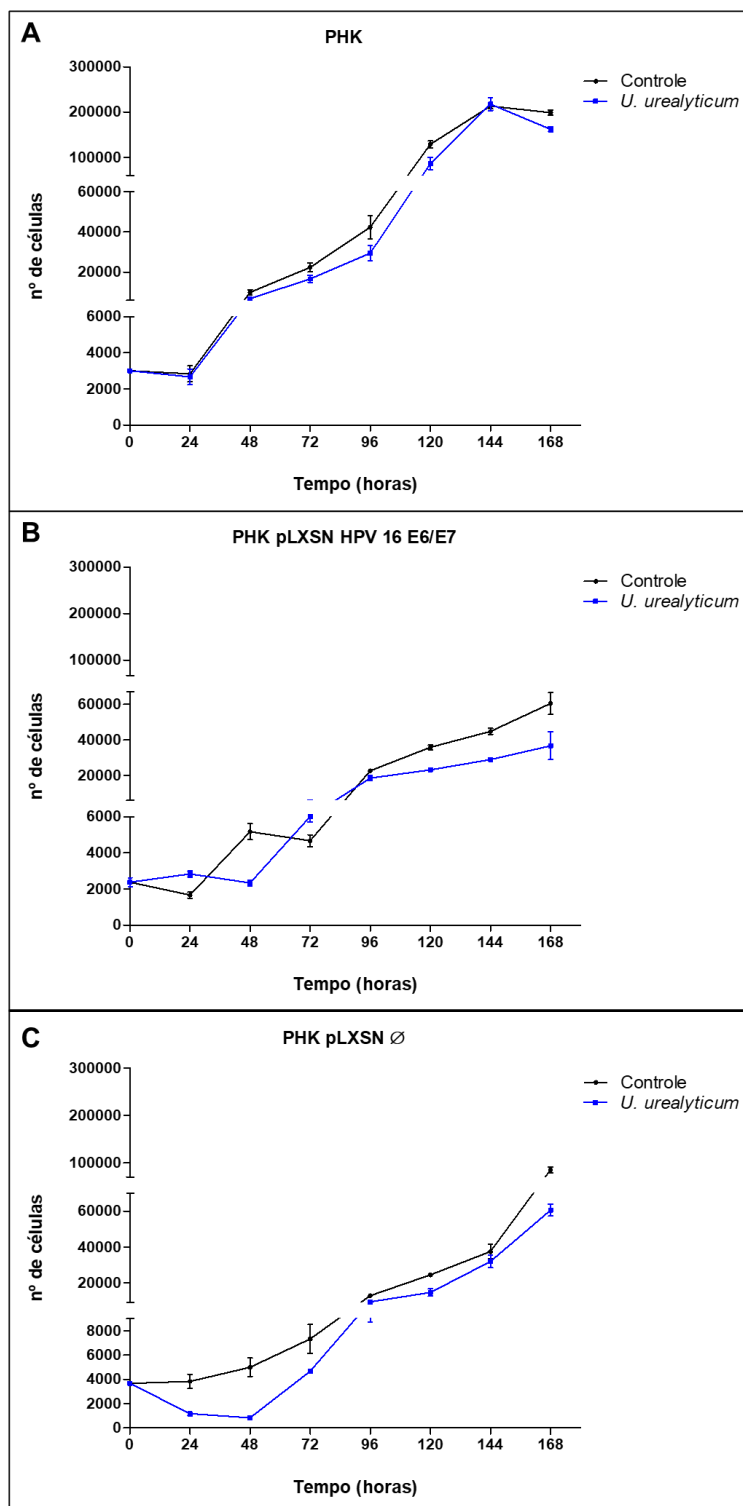
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3 - 7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. urealyticum* com MOI 6 – 23. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

Figura 29 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *U. urealyticum*.



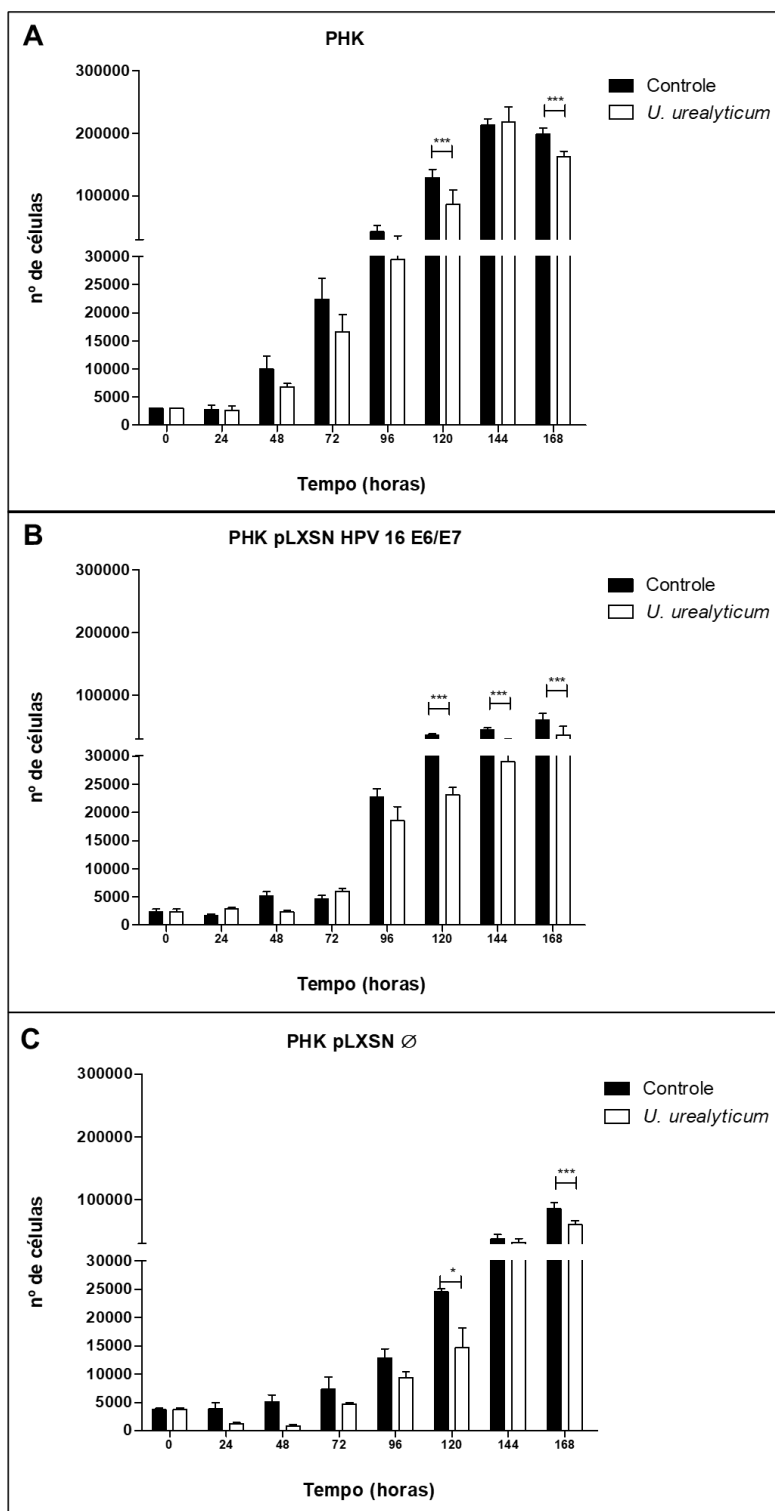
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3 - 7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. urealyticum* com MOI 6 – 23. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Figura 30 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *U. urealyticum*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. urealyticum* com MOI $1,1 \times 10^2$ – $4,6 \times 10^2$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

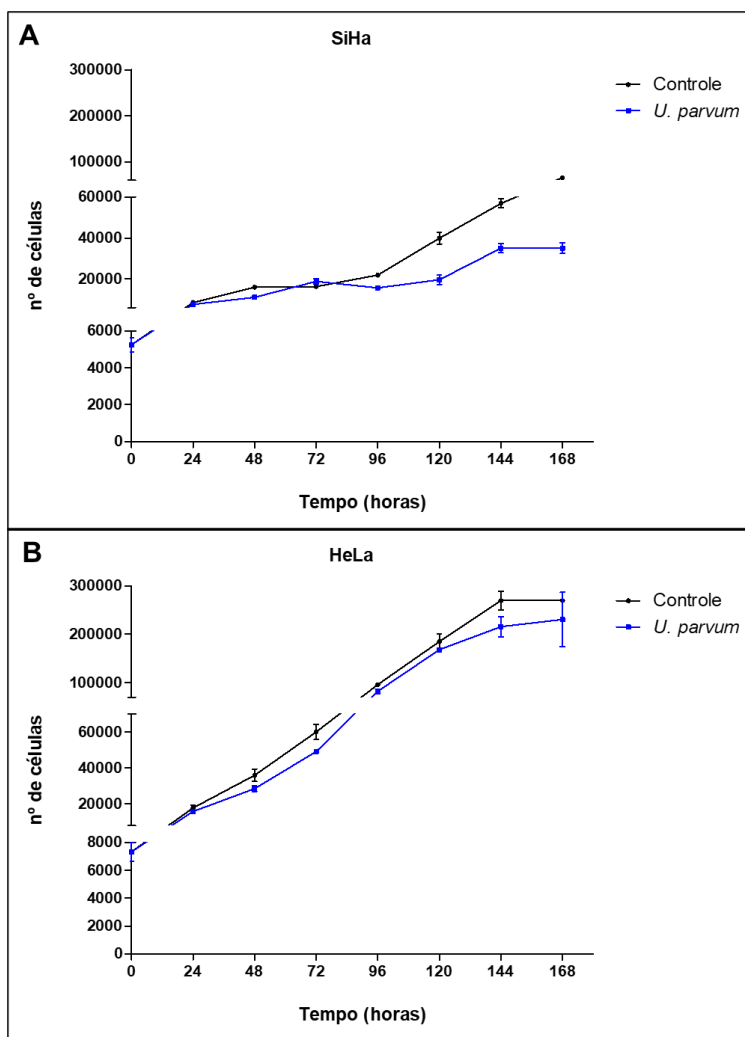
Figura 31 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *U. urealyticum*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. urealyticum* com MOI $1,1 \times 10^2$ – $4,6 \times 10^2$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

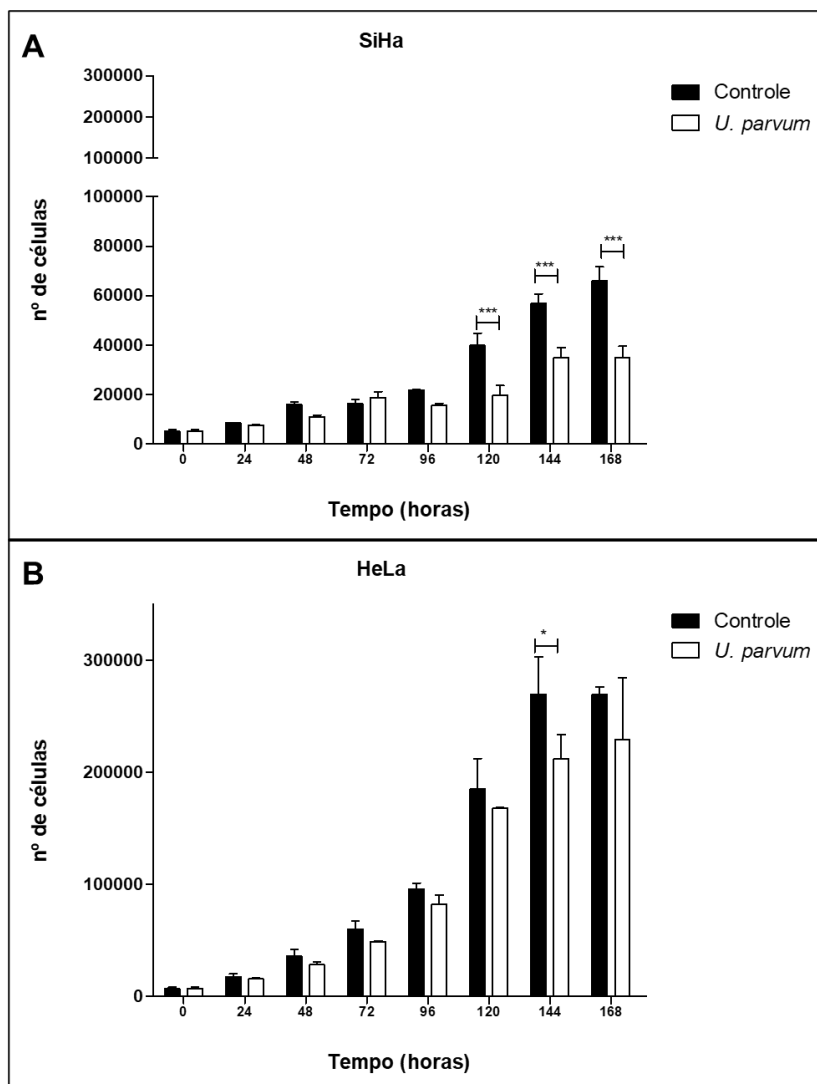
Observando os resultados da infecção por *U. parvum* sobre as linhagens celulares, houve diminuição na viabilidade de SiHa apenas a partir de 120h (Figuras 32A e 33A), com aumento do DT das células infectadas (69,6h) quando comparado com o controle (52,8h) (Quadro 7). Com relação às células HeLa, houve diferença no número de células viáveis apenas após 144h de infecção (Figuras 32B e 33B), não afetando o DT e nem a taxa de duplicação das células nos períodos analisados. Com relação aos queratinócitos (Figuras 34 e 35), houve diminuição do número de células viáveis após 96h de infecção por *U. parvum* em PHK (Figuras 34A e 35A) e após 168h em pLXSN Ø (Figuras 34C e 35C). Não houve diferença estatisticamente significativa entre PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 infectadas ou não pelo micro-organismo (Figuras 34B e 35B). Foi observado o aumento nas taxas de duplicação para PHK (1,6), PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 (1,3) e diminuição para pLXSN Ø (0,8) quando comparado com o controle (Quadro 7).

Figura 32 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *U. parvum*.



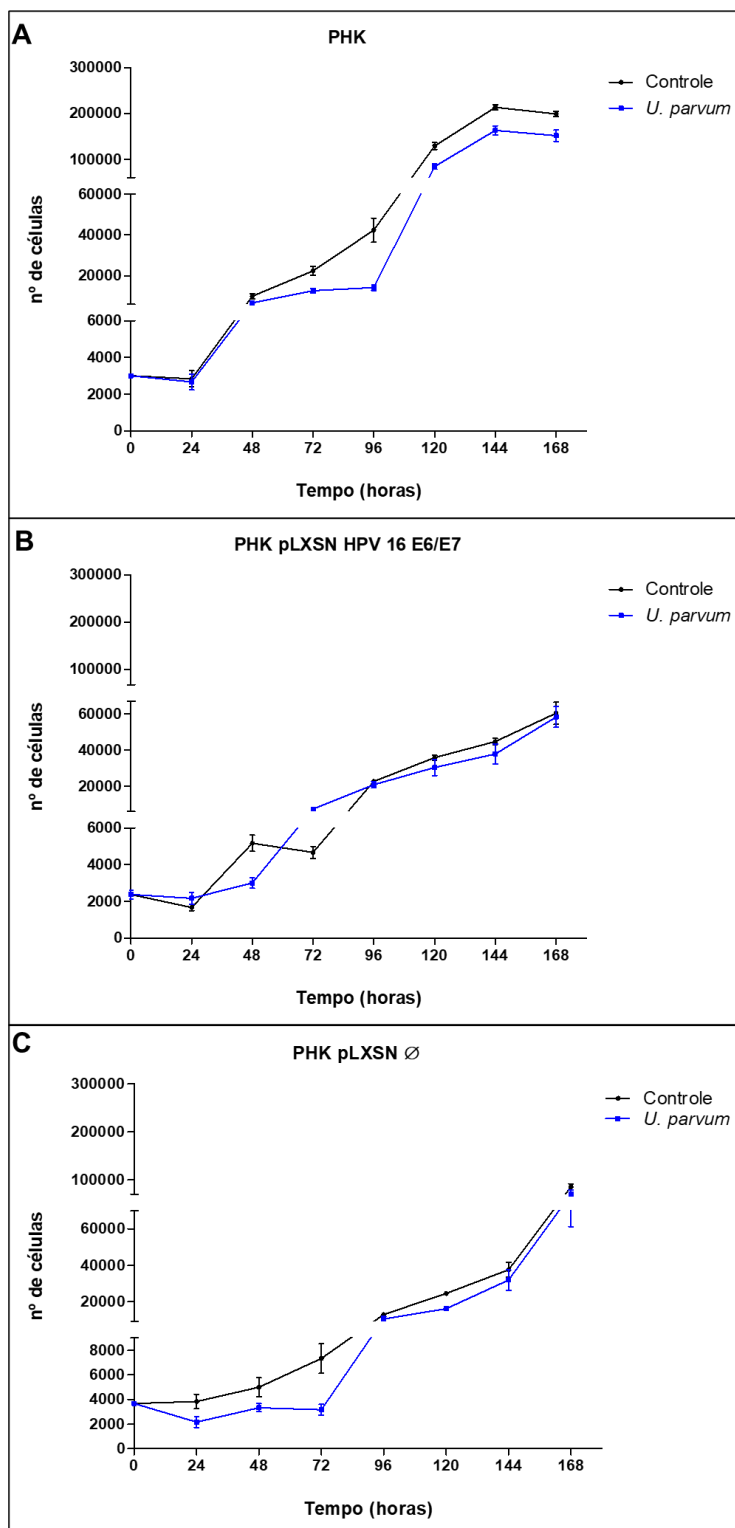
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3 - 7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. parvum* com MOI $2,2 \times 10^2 - 6,4 \times 10^3$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

Figura 33 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de SiHa e HeLa após infecção por *U. parvum*.



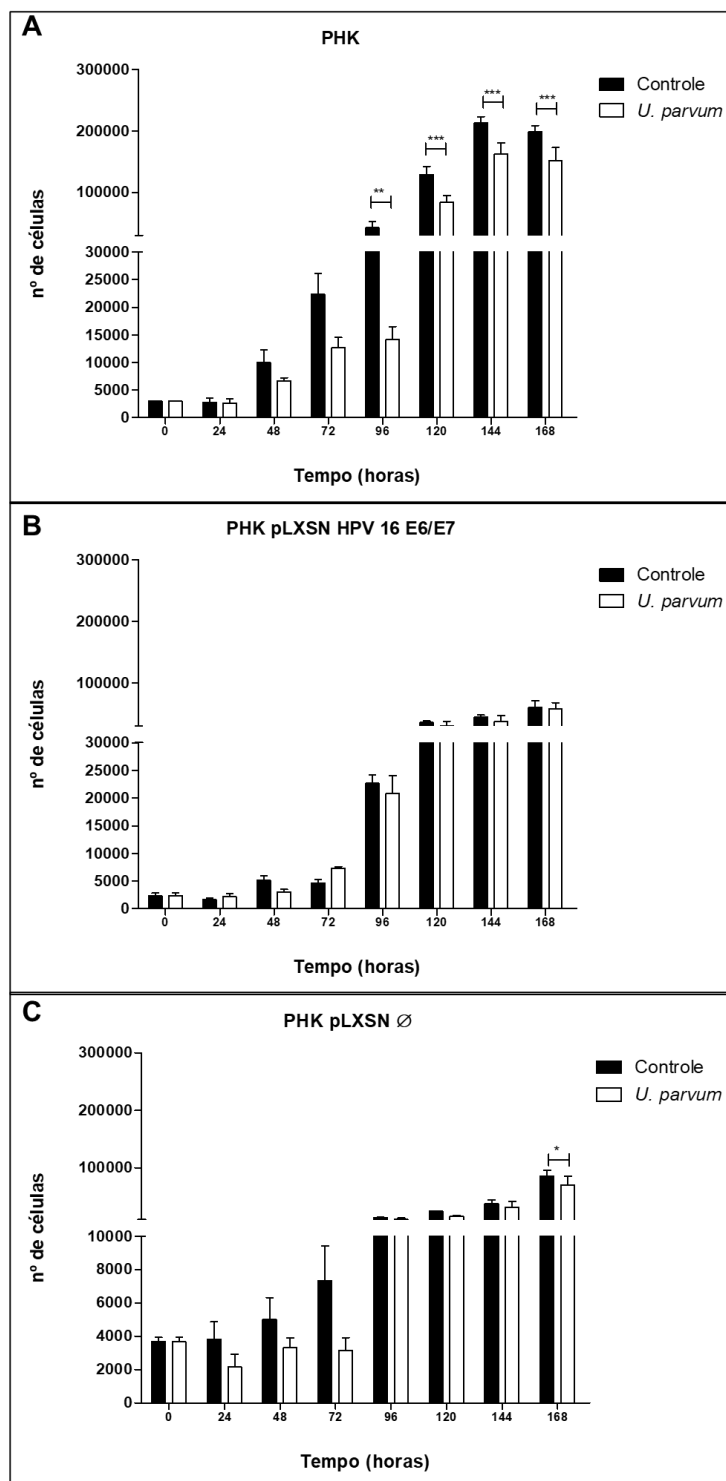
Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 5,1 \times 10^3$ – $7,3 \times 10^3$ células: A) SiHa e B) HeLa. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. parvum* com MOI $2,2 \times 10^2$ – $6,4 \times 10^3$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Figura 34 – Gráfico em linhas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *U. parvum*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. parvum* com MOI $1,4 \times 10^3$ - $5,4 \times 10^3$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e os pontos das curvas representam a média do número de células obtidos com seus respectivos desvios-padrão.

Figura 35 – Gráfico em colunas para representação das curvas de crescimento de PHK, PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e PHK pLXSN Ø após infecção por *U. parvum*.



Legenda: O plaqueamento foi realizado com um intervalo de $\sim 2,3 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^3$ células: A) PHK; B) PHK pLXSN HPV 16 E6/E7 e C) PHK pLXSN Ø. Após adesão das células às placas por 12-24 horas foi realizada a infecção por *U. parvum* com MOI $1,4 \times 10^3$ - $5,4 \times 10^3$. Após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de a infecção, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Os ensaios foram feitos em triplicata, e as alturas de cada coluna representam a média do número de células obtidas em cada tempo de infecção, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

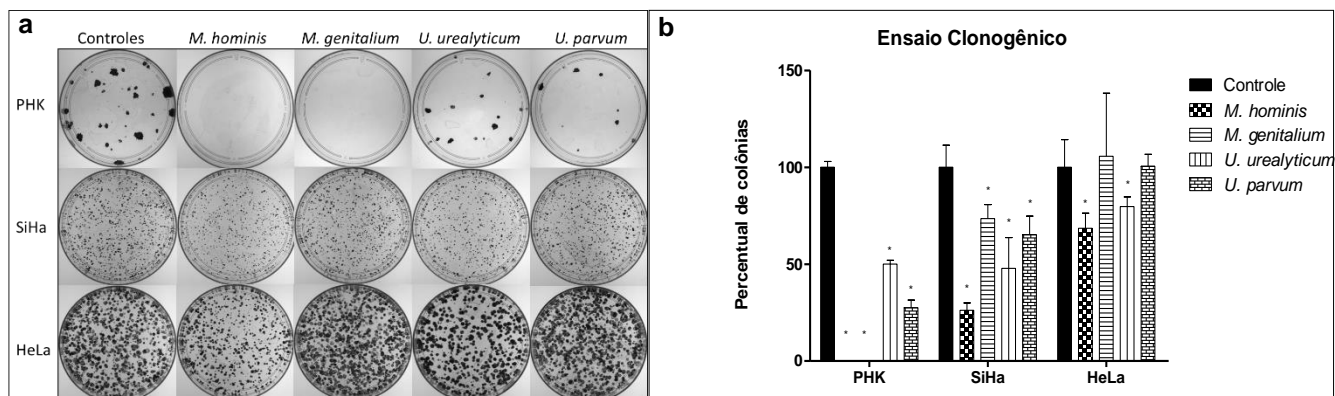
De maneira geral, podemos verificar que a infecção por *M. hominis* resulta em efeitos na viabilidade celular mais precocemente, ou seja, com pouco tempo de contato com as células. Em relação às células imortalizadas e transformadas, o efeito de *M. hominis* na viabilidade de HeLa foi mais pronunciado do que em SiHa. Em relação aos queratinócitos, infecção por *M. hominis* resultou em menor número de células viáveis ao longo do tempo, principalmente nas linhagens com vetor expressando ou não os oncogenes E6/E7 de HPV 16. Com relação a *M. genitalium*, conclui-se que a infecção em SiHa e em HeLa altera a viabilidade das células de maneira menos evidente e apenas após períodos maiores de infecção. Para as linhagens de queratinócitos, o efeito é mais pronunciado do que nas linhagens imortalizadas, principalmente entre aquelas contendo os vetores pLXSN Ø e pLXSN HPV 16 E6/E7. Verificamos que a infecção por *U. urealyticum* causa efeitos sobre a viabilidade celular de forma mais tardia sobre as cinco linhagens celulares estudadas. O mesmo ocorre para *U. parvum*, mas apenas em SiHa, HeLa e PHK.

5.4 Ensaio clonogênico

Com a finalidade de observar a sobrevivência e/ou a proliferação de células, foi realizado o ensaio clonogênico. A quantidade de colônias que proliferaram após 15 dias de infecção pelos micro-organismos foram quantificadas e comparadas com o grupo controle. Os resultados foram expressos em percentual utilizando como referência (100%) o grupo controle de cada linhagem celular. Como pode ser observado na Figura 36, houve diminuição da proliferação celular nos grupos infectados por *M. hominis* e *U. urealyticum* ($p < 0,05$). Porém, comparativamente, a MOI utilizada para *U. urealyticum* ($3,3 \times 10^4$) foi maior ($\sim 7500x$) do que para *M. hominis* (4,44). Tanto *M. genitalium* quanto *U. parvum* causaram a diminuição da proliferação de PHK e SiHa, mas também com MOI maiores ($1,8 \times 10^4$ e $1,02 \times 10^5$, respectivamente) do que a utilizada para *M. hominis*.

Conclui-se que as infecções pelas quatro espécies de *Mollicutes* foram capazes de diminuir a formação de colônias principalmente em SiHa e em PHK, entretanto, apenas *M. hominis* e *U. urealyticum* foram capazes de diminuir a formação de colônias das células HeLa. Entretanto, *M. hominis* demonstrou um efeito mais pronunciado quando comparado com os outros micro-organismos.

Figura 36 – Ensaio clonogênico realizado com células SiHa, HeLa e PHK após infecção por *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*.

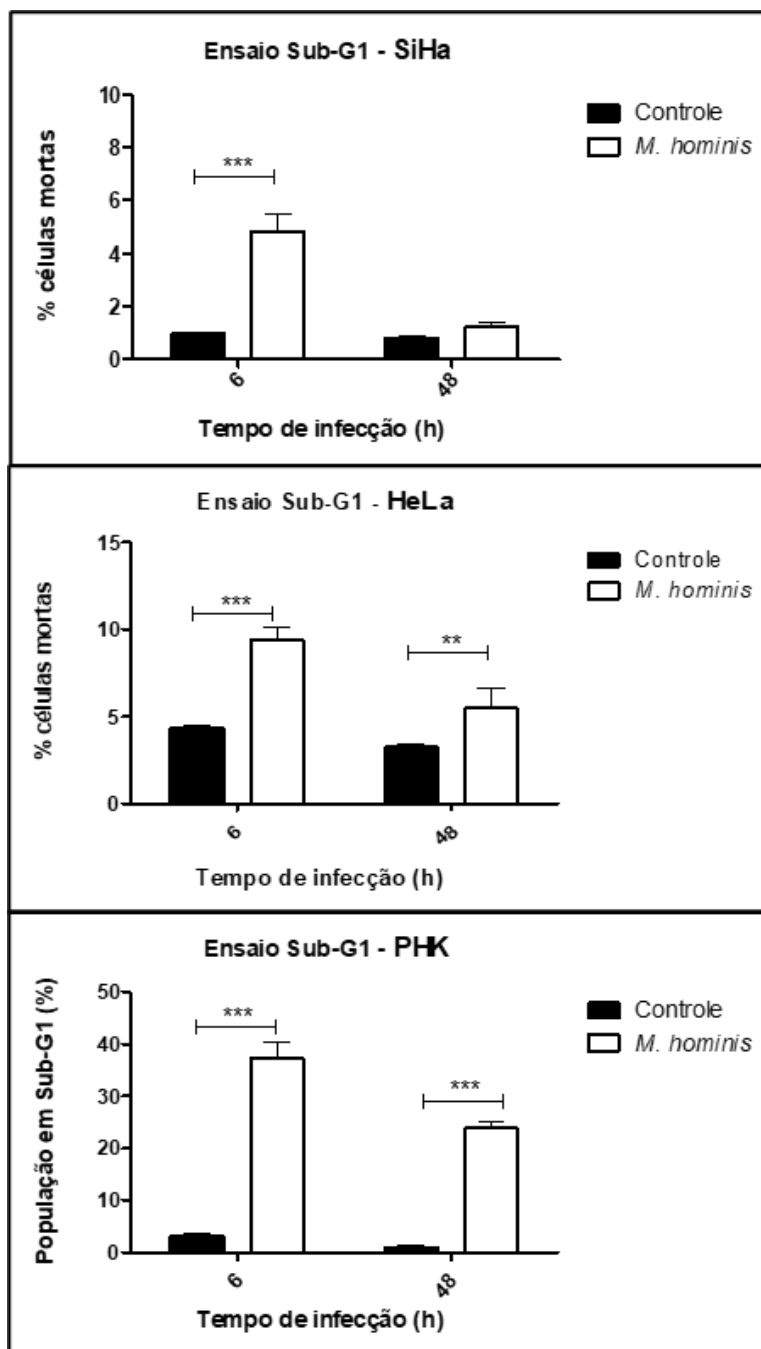


Legenda: a) Fotografia das placas de Petri em um dos ensaios. Colônias coradas por cristal violeta e contadas utilizando o aplicativo Promega Colony Counter (Promega®). b) Inibição em percentual da formação de colônias após 15 dias de infecção. Quantidade de células plaqueadas inicialmente ~1000. MOI dos micro-organismos para infecção: *M. hominis* 4,44; *M. genitalium* $1,8 \times 10^4$; *U. urealyticum* $3,3 \times 10^4$; *U. parvum* $1,02 \times 10^5$. Análise estatística: Mann-Whitney unicaudal, nível de significância de 95%

5.5 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para avaliar se as infecções por *M. hominis* são capazes de causar danos às células capazes de levar à fragmentação do DNA, que poderiam ou não induzir as células a apoptose, foi realizada a análise da quantidade de células presentes na fase Sub-G0/G1. Como cada fase do ciclo celular possui uma quantidade específica de DNA, podemos caracterizar a fase do ciclo em que a célula se encontra (Sub-G0/G1, G1, S e G2/M) pela incorporação de corantes fluorescentes como o iodeto de propídio (PI) e analisando por citometria de fluxo. A fase Sub-G0/G1 está relacionado à diminuição do conteúdo de DNA devido à fragmentação e indução de apoptose. Foi observado durante este ensaio que o percentual de células infectadas por *M. hominis* apresentou aumento de células na fase Sub-G0/G1 em todas as linhagens celulares após 6 horas de infecção quanto comparado com o controle. Entretanto, após 48 horas de infecção, esse resultado só foi observado em PHK e HeLa (Figura 37).

Figura 37 – Análise das células SiHa, HeLa e PHK presentes na fase Sub-G0/G1 do ciclo celular após infecção por *M. hominis*.



Legenda: Análise realizada a partir dos dados obtidos dos histogramas provenientes da citometria de fluxo realizada após infecção por *M. hominis* utilizando MOI 0,01- 0,04 em $1,5 \times 10^5$ células SiHa, HeLa e PHK. As células foram coletadas após 6h e 48 horas de infecção. As barras representam o percentual médio das células presentes na fase Sub-G0/G1 do ciclo celular, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Nível de significância de 95%. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).

Com a finalidade de verificar diferenças na distribuição das populações celulares das linhagens SiHa, HeLa e PHK nas diferentes fases do ciclo celular após 6 e 48 horas de infecção por *M. hominis*, foi realizada a quantificação das células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular por meio de citometria de fluxo. Com o intuito de verificar se as alterações observadas eram inerentes da própria célula pelo tempo em cultivo ou se foi causada pelo micro-organismo, foram realizadas as seguintes análises: a) controle 6h X células infectadas com *M. hominis* após 6 horas de infecção; b) controle 48h X células infectadas com *M. hominis* após 48 horas de infecção; c) controle 6h x controle 48h e e) células infectadas por *M. hominis* após 6h x células infectadas por *M. hominis* após 48 horas (Figura 38).

Em relação às células SiHa, observamos que não houve diferença entre a distribuição de células entre o grupo controle e as células infectadas por *M. hominis* em nenhuma das fases do ciclo, tanto após 6 horas quanto 48 horas de infecção. Entretanto, ao realizar a análise pareada entre os grupos controle (6h x 48h) observamos que houve um aumento do número de células na fase G1 do grupo controle após 48 horas de infecção. Consequentemente, houve diminuição das populações celulares nas fases S e G2 após 48 horas. O mesmo ocorreu ao compararmos as células infectadas com *M. hominis* após 6 horas e 48 horas de infecção (Figura 38), o que provavelmente demonstra um efeito inerente à célula independentemente da infecção.

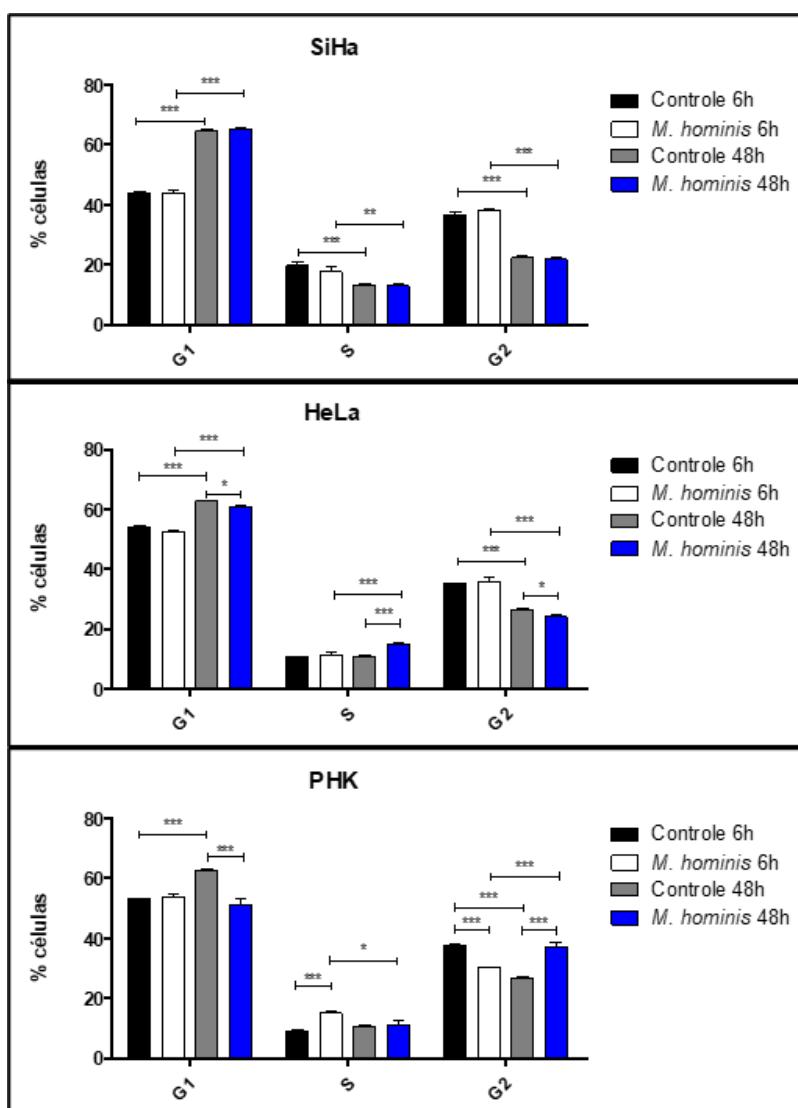
Com relação às células HeLa, não observamos nenhuma diferença nas três fases do ciclo celular ao comparar o grupo controle e as células infectadas após 6 horas de infecção. Entretanto, observamos uma diminuição da população celular nas fases G1 e G2 no grupo de células infectadas quando comparadas ao grupo controle após 48 horas de infecção e um aumento do número de células na fase S. Ao realizar uma análise pareada entre os controles após 6 e 48 horas, observamos um aumento das células em G1 após 48 horas de infecção e uma diminuição em G2. A mesma análise foi feita comparando os grupos infectados por *M. hominis* após 6 e 48 horas, e constatamos um efeito análogo à análise dos controles, mas também foi observado aumento da população na fase S, o que não aconteceu no grupo controle (Figura 38).

Analisando as células PHK, não foi observada alterações na fase G1 entre as células infectadas após 6 horas de infecção quando comparado com o grupo controle. Porém, observamos um aumento da população celular em S e uma diminuição em G2 nas 6 horas de infecção. Após 48 horas de infecção, verifica-se uma diminuição da população em G1 e aumento em G2, e nenhum efeito em S quando comparamos o grupo de células infectadas com o grupo controle. Com relação à análise pareada dos controles, observa-se um aumento da população em G1 após 48 horas de infecção e uma diminuição em G2. Nenhum efeito foi visto para a fase S. Sobre a

análise pareada das células infectadas após 6 e 48 horas de infecção, houve diminuição da população de células na fase S e aumento em G2 (Figura 38).

Podemos concluir que a infecção por *M. hominis* resultou em aumento das células PHK na fase S do ciclo celular após 6 horas de infecção e na fase G2 após 48 horas de infecção. Com relação à HeLa, observou-se aumento das células na fase S após 48 horas de infecção. Não foram observadas alterações significativas para SiHa. Portanto, a infecção por *M. hominis* leva a alterações no ciclo celular de maneira distinta para cada linhagem celular.

Figura 38 – Análise das células SiHa, HeLa e PHK presentes nas diferentes fases do ciclo celular após infecção por *M. hominis*



Legenda: Análise realizada a partir dos dados obtidos dos histogramas provenientes da citometria de fluxo realizada após infecção por *M. hominis* utilizando MOI 0,01- 0,04 em $1,5 \times 10^5$ células SiHa, HeLa e PHK. As células foram coletadas após 6h e 48 horas de infecção. As barras representam o percentual médio das células presentes nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, com seus respectivos desvios-padrão. Two way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Nível de significância de 95%. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

5.6 Quantificação de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose

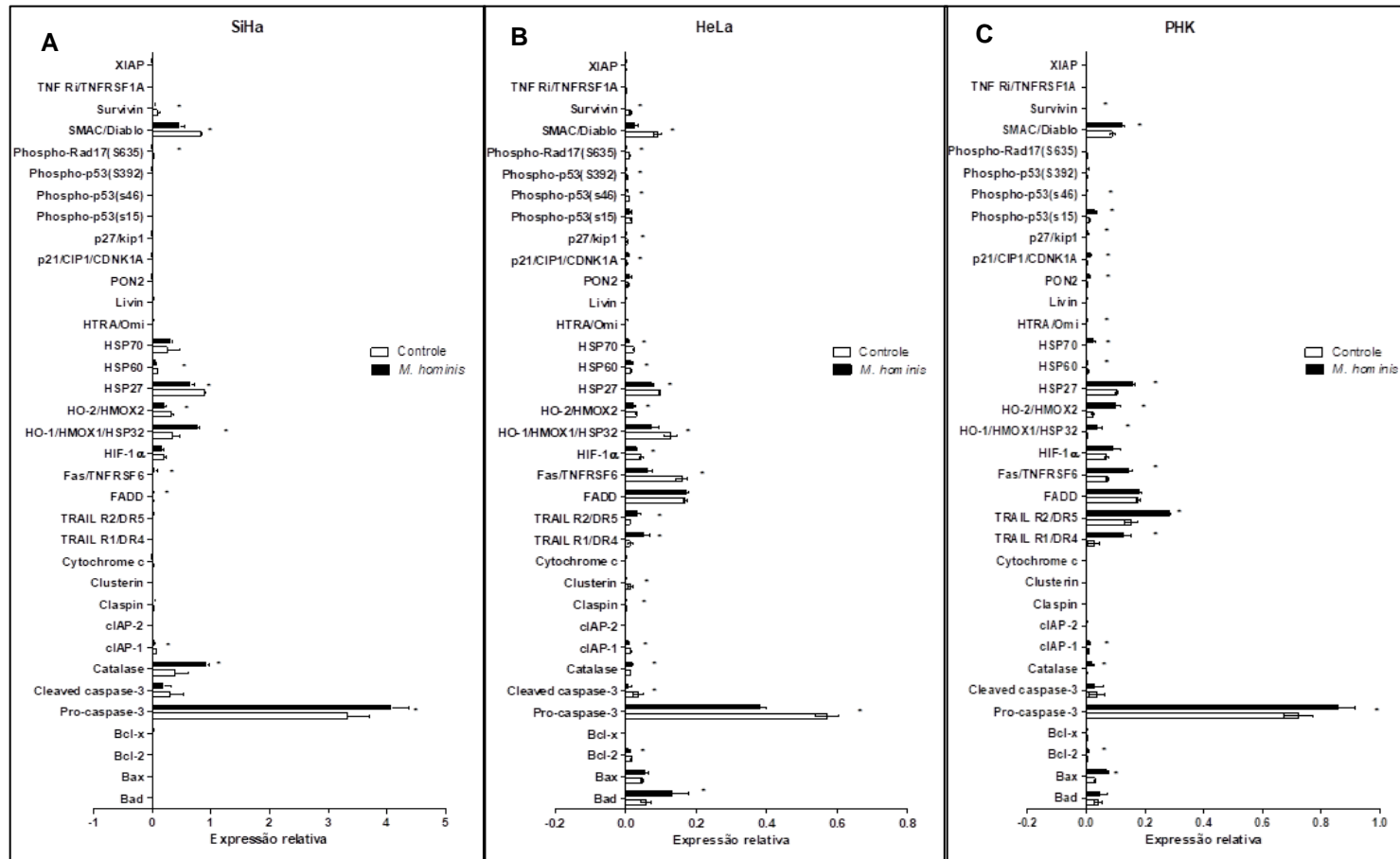
Ao analisarmos os níveis de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose pelo kit *Human Apoptosis Array* (Proteome Profiler, R&D Systems, Minneapolis, USA), foi observado que houve diferença quanto à expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas tanto em células SiHa quanto em HeLa e em PHK. A figura 39 representa uma análise global das proteínas quantificadas utilizando o kit. O quadro 8 demonstra esquematicamente se a infecção por *M. hominis* ocasionou o aumento (verde), diminuição (vermelho) ou nenhuma alteração (amarelo) da expressão das proteínas envolvidas na regulação/execução da apoptose após análise estatística.

Ao realizar uma análise comparativa entre as três linhagens, foi observado que apenas a catalase foi igualmente expressa. Quando realizada a comparação entre o padrão de expressão entre as linhagens transformadas contra o padrão dos queratinócitos normais (PHK), houve repressão da expressão de cIAP, HO-2/HMOX2, HSP27, Rad17 fosforilado (S635), SMAC/Diablo e Survivina em SiHa e HeLa ao passo que em PHK houve aumento ou indiferença na expressão das referidas proteínas (Figura 39 e Quadro 8).

Analisando individualmente a expressão em cada linhagem celular, verificou-se que a infecção por *M. hominis* em SiHa levou ao aumento dos níveis de Pro-Caspase-3, Caspase-3 ativada, FADD, Fas/TNFRSF6/CD95 e HO-1/HMOX1/HSP32 e à diminuição de cIAP-1, HO-2/HMOX2, HSP27, HSP60, Phospho-Rad17 (S635), SMAC/Diablo e Survivina. Nas linhagem de células HeLa, a infecção resultou no aumento de Bad, Catalase, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, HSP60 e p21/CIP1/CDKN1A e na diminuição dos níveis de Bcl-2, Pro-Caspase-3, Caspase-3 ativada, cIAP-1, Claspina, Clusterina, Fas/TNFRSF6/CD95, HIF-1 alpha, HO-1/HMOX1/HSP32, HO-2/HMOX2, HSP27, HSP70, p27/Kip1, Phospho-p53 (S46), Phospho-p53 (S392), Phospho-Rad17 (S635), SMAC/Diablo e Survivina. Nos queratinócitos normais (PHK), a infecção ocasionou o aumento da expressão de Bax, Bcl-2, Pro-Caspase-3, Catalase, cIAP-1, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, Fas/TNFRSF6/CD95, HO-1/HMOX1/HSP32, HO-2/HMOX2, HSP27, HSP60, HSP70, HTRA2/Omi, PON2, p21/CIP1/CDKN1A, p27/Kip1, Phospho-p53 (S15), Phospho-p53 (S46), SMAC/Diablo e Survivina. Não houve diminuição dos níveis de nenhuma das proteínas testadas após a infecção.

Portanto, é possível concluir que a expressão das proteínas envolvidas na regulação/ativação da apoptose ocorreram de maneira diferente para SiHa, HeLa e PHK após infecção por *M. hominis*. Para SiHa houve um equilíbrio entre a expressão/regulação de proteínas pró e anti-apoptóticas. Para HeLa e PHK houve um predomínio de uma regulação pró-apoptótica.

Figura 39 – Efeito da infecção por *M. hominis* na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose.



Legenda: A expressão de 35 proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose foi avaliada em 200 μ g de extratos proteicos totais obtidos de culturas em monocamada de HeLa, SiHa e PHK infectados ou não com *M. hominis* por 48h. O ensaio foi realizado utilizando o kit *Human Apoptosis Array* (R&D Systems) e os resultados foram analisados utilizando o programa ImageJ e tabulados utilizando o programa GraphPad Prism. O ensaio foi feito em duplicata e o resultado apresentado é a mediana dos valores obtidos, e as barras representam a amplitude total dos dados. Os asteriscos representam a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo infectado.

Quadro 8 – Efeito da infecção por *M. hominis* na expressão de proteínas envolvidas na regulação/ativação de apoptose em células SiHa, HeLa e PHK.

Proteínas	SiHa	HeLa	PHK
Bad	Amarelo	Verde	Verde
Bax	Amarelo	Verde	Verde
Bcl-2	Amarelo	Vermelho	Verde
Bcl-x	Amarelo	Verde	Verde
Pro-Caspase-3	Verde	Vermelho	Verde
Cleaved Caspase-3	Amarelo	Vermelho	Verde
Catalase	Verde	Verde	Verde
cIAP-1	Vermelho	Vermelho	Verde
cIAP-2	Amarelo	Verde	Verde
Claspin	Amarelo	Vermelho	Verde
Clusterin	Amarelo	Verde	Verde
Cytochrome c	Amarelo	Verde	Verde
TRAIL R1/DR4	Amarelo	Verde	Verde
TRAIL R2/DR5	Amarelo	Verde	Verde
FADD	Verde	Verde	Verde
Fas/TNFRSF6/CD95	Amarelo	Vermelho	Verde
HIF-1 alpha	Amarelo	Vermelho	Verde
HO-1/HMOX1/HSP32	Verde	Vermelho	Verde
HO-2/HMOX2	Vermelho	Vermelho	Verde
HSP27	Vermelho	Verde	Verde
HSP60	Vermelho	Verde	Verde
HSP70	Amarelo	Vermelho	Verde
HTRA2/Omi	Amarelo	Verde	Verde
Livin	Amarelo	Verde	Verde
PON2	Amarelo	Verde	Verde
p21/CIP1/CDKN1A	Amarelo	Verde	Verde
p27/Kip1	Amarelo	Vermelho	Verde
Phospho-p53 (S15)	Amarelo	Verde	Verde
Phospho-p53 (S46)	Amarelo	Vermelho	Verde
Phospho-p53 (S392)	Amarelo	Vermelho	Verde
Phospho-Rad17 (S635)	Vermelho	Vermelho	Verde
SMAC/Diablo	Vermelho	Vermelho	Verde
Survivin	Vermelho	Vermelho	Verde
TNF RI/TNFRSF1A	Amarelo	Verde	Verde
XIAP	Amarelo	Verde	Verde

Legenda: Figura baseada nos dados de expressão das proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose. Amarelo - não houve diferença na expressão da proteína entre as células infectadas ou não por *M. hominis*. Verde - aumento da expressão da proteína entre as células infectadas com *M. hominis*, quando comparado com as não infectadas. Vermelho - diminuição da expressão da proteína entre as células infectadas com *M. hominis*, quando comparado com as não infectadas.

5.7 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

O rendimento e qualidade do RNA foram verificados através de espectrofotometria no NanoDrop2000® após tratamento com DNase para eliminação de contaminação com DNA genômico. Tanto para as análises da expressão dos genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 presentes em SiHa e em HeLa, respectivamente, bem como dos genes relacionados à via de Toll-like e das vias de dano ao DNA, os rendimentos obtidos foram de 110-600 ng/μL. A qualidade das amostras foi verificada por meio das relações 260/280 e 260/230, as quais foram de aproximadamente 1,8-

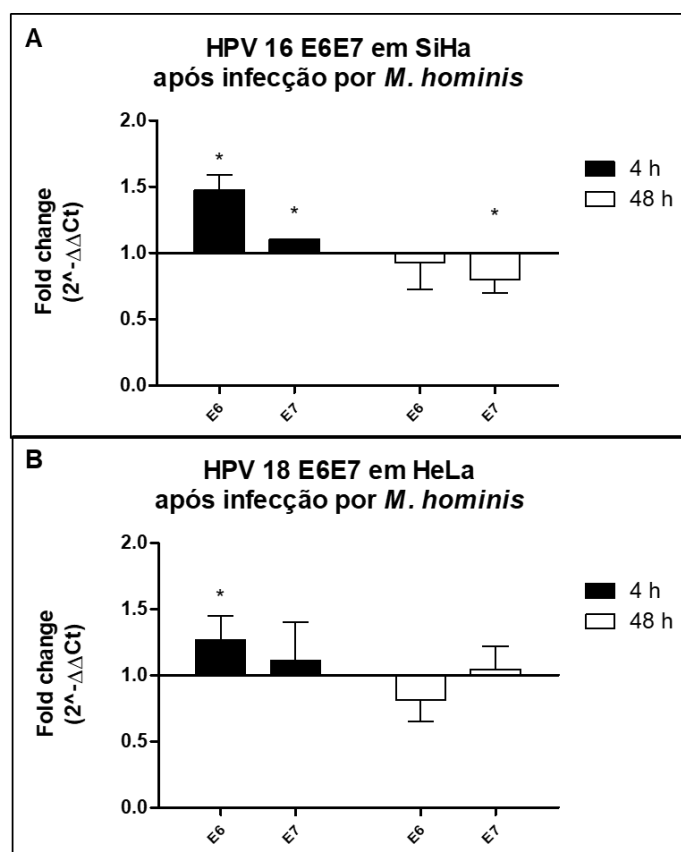
2,0 e 1,0-1,8 respectivamente. A qualidade também foi aferida pela corrida dos RNAs obtidos em gel de agarose, onde foi observado bandas únicas correspondentes às subunidades 28S, 18S e 5,8S, sem sinais de arraste ou fragmentações (Figuras 12 e 13, vistas em Material e Métodos). Para se verificar a especificidade dos primers utilizados no ensaio foram observadas as curvas de *melting*, as quais apresentaram picos únicos e específicos para cada gene analisado. A partir disso, foram realizadas as transcrições reversas e os ensaios de RT-qPCR mencionados.

5.7.1 Análise da expressão dos genes E6 e E7 de HPV 16 (SiHa) e HPV 18 (HeLa)

Os perfis de expressão gênica de E6 e E7 dos HPV 16 e HPV 18 foram analisados em SiHa e em HeLa por PCR em tempo real usando os cDNAs de cada linhagem celular obtidos após 4 e 48 horas de infecção por *M. hominis*. As células não infectadas foram utilizadas como controle. O cDNA de GAPDH foi amplificado em todas as amostras para normalizar os níveis de expressão do gene viral. As figuras 40 A e B representam os níveis de alteração na expressão relativos aos controles ($\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$). Ao analisar as células SiHa, foi observado que o nível de expressão de E6 de HPV 16 foi 1,5x maior entre as células infectadas por *M. hominis*. Em relação à expressão de E7, houve um aumento da expressão (1,1x) após 4 horas de infecção e uma diminuição (0,8x) da sua expressão após 48 horas de infecção (Figura 40 A). Com relação à HeLa, a expressão de E6 de HPV 18 foi 1,3x maior entre as células com *M. hominis* após 4 horas de infecção (Figura 40 B). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de E7 de HPV 18 em HeLa (Figura 40 B).

Portanto, verifica-se que a infecção por *M. hominis* é capaz de afetar os níveis de mRNA dos oncogenes E6/E7 de HPV 16 e HPV 18 presentes em SiHa e em HeLa, respectivamente, e que essa regulação é dependente do tempo.

Figura 40 - Análise da expressão dos genes E6/E7 do HPV 16 e HPV 18 por RT-qPCR.



Legenda: Expressão relativa dos genes E6/E7 do HPV 16 em A) SiHa e E6/E7 do HPV 18 em B) HeLa. A expressão de cada gene viral após a infecção por *M. hominis* foi analisada comparando-se com a de células não infectadas, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo o valor de $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ das células infectadas por *M. hominis* - ΔCt das células controle. As colunas representam a média das replicatas biológicas, e as barras representam o desvio padrão das amostras. Os valores de ΔCt para cada transcrição amplificada foram calculados subtraindo o respectivo valor de Ct do correspondente Ct do gene de referência GAPDH ($\Delta Ct = Ct_x - Ct_{GAPDH}$). Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney unicaudal, nível de significância de 95%) dos valores de ΔCt calculados entre os grupos de células infectadas e não infectadas por *M. hominis*.

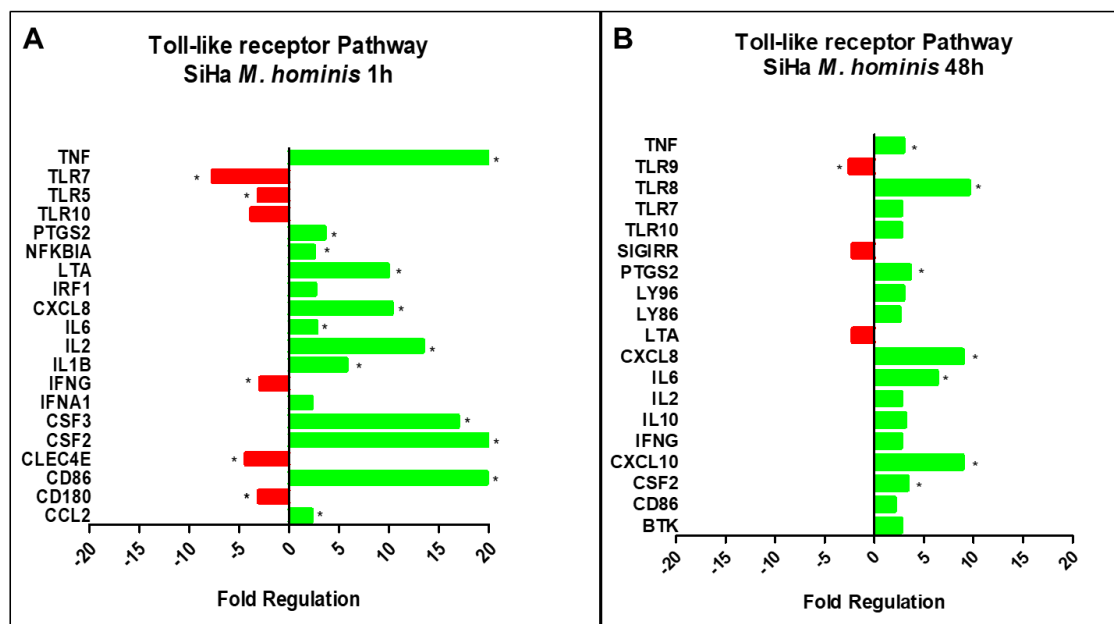
5.7.2 Análise da expressão dos genes relacionados à via dos receptores do tipo Toll

As figuras de 41 a 43 mostram a análise de expressão de genes ligados às vias dos receptores do Toll em culturas de SiHa, HeLa e PHK infectadas ou não por *M. hominis* após 1 e 48 horas de infecção. Para as análises estatísticas foram considerados apenas os genes que apresentaram expressão 2 vezes maior ou menor do que o grupo de células não infectadas (controle).

A figura 41 mostra que as células SiHa, após 1 hora de infecção por *M. hominis*, apresentaram regulados positivamente (em verde) os genes *CCL2*, *CD86*, *CSF2*, *CSF3*, *IL1B*, *IL2*, *IL6*, *CXCL8*, *LTA*, *NFKBIA*, *PTGS2* e *TNF*, e negativamente os genes *CD180*, *CLEC4E*, *IFNG*,

TLR5 e *TLR7*. Após 48 horas de infecção, sete genes foram regulados positivamente (*CSF2*, *CXCL10*, *IL6*, *CXCL8*, *PTGS2*, *TLR8* e *TNF*) e apenas um regulado negativamente (*TLR9*).

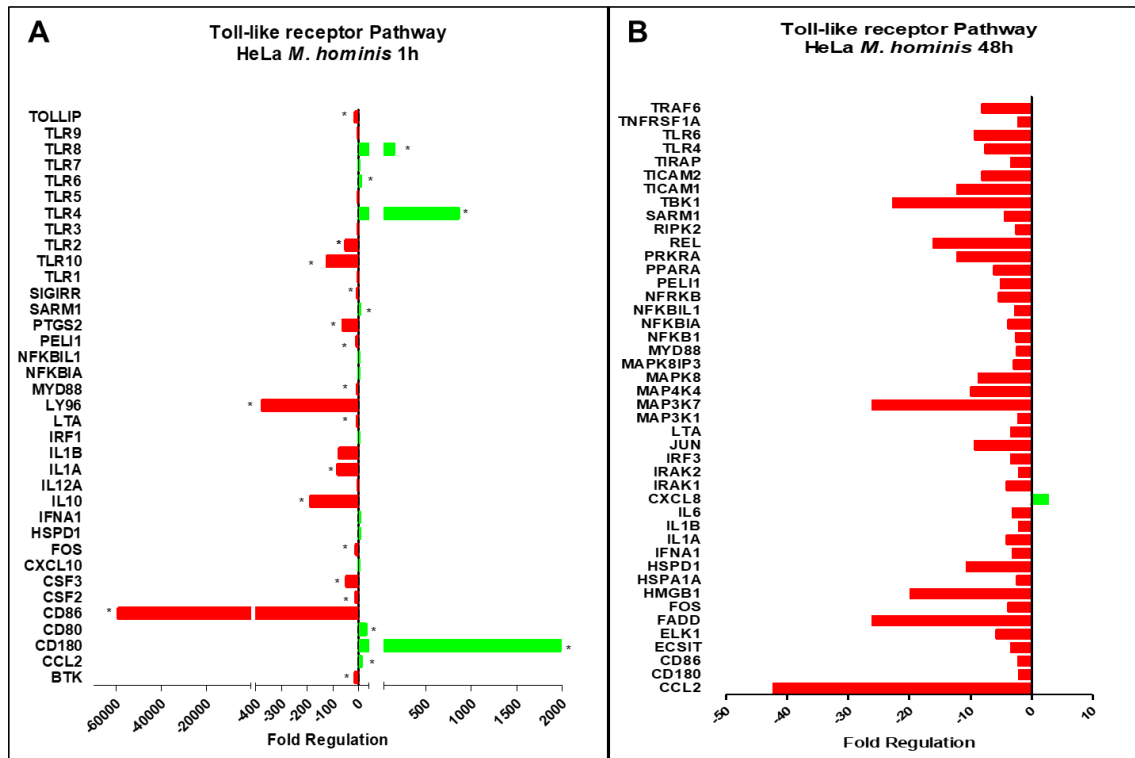
Figura 41 – Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias dos receptores do tipo Toll em células SiHa infectadas por *M. hominis*.



Legenda: A) 1 hora de infecção por *M. hominis* e B) 48 horas de infecção por *M. hominis*. Regulação positiva (verde) e regulação negativa (vermelho) de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0,05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism).

Com relação às células HeLa infectadas por 1h com *M. hominis*, os genes que apresentaram regulação positiva (com diferença estatisticamente significativa com relação ao controle) foram *CCL2*, *CD180*, *CD80*, *SARM1*, *TLR4*, *TLR6* e *TLR8*. Os genes *BTK*, *CD86*, *CSF2*, *SF3*, *FOS*, *IL10*, *IL1A*, *LTA*, *LY96*, *MYD88*, *PELI1*, *PTGS2*, *SIGIRR*, *TLR10*, *TLR2* e *TOLLIP* foram regulados negativamente. Após 48 horas, não foram encontradas alterações na expressão gênica com diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas (Figura 42).

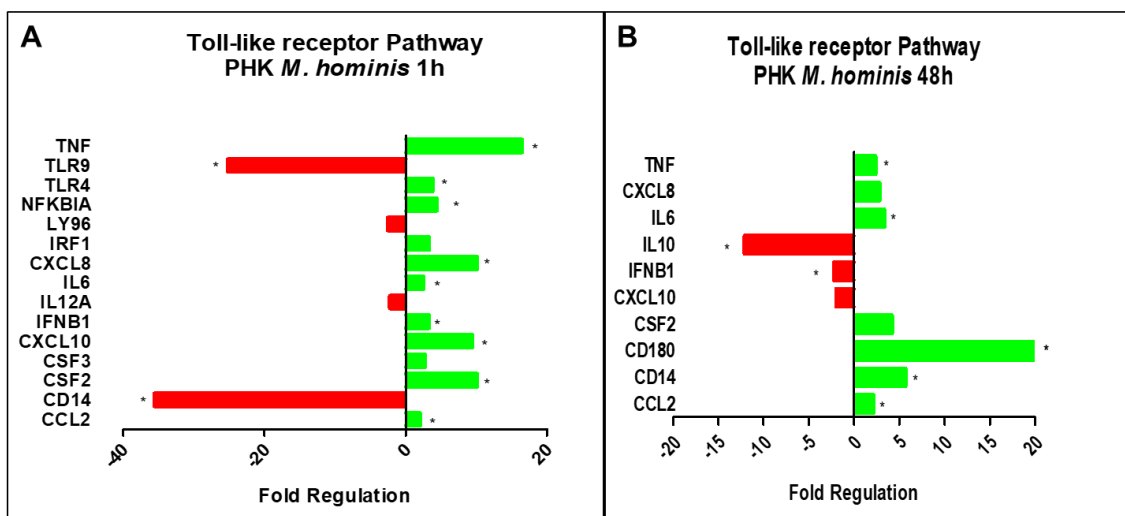
Figura 42 – Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias dos receptores do tipo Toll em células HeLa infectadas por *M. hominis*.



Legenda: A) 1 hora de infecção por *M. hominis* e B) 48 horas de infecção por *M. hominis*. Regulação positiva (verde) e regulação negativa (vermelho) de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0,05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism).

As células PHK, após 1 hora de infecção por *M. hominis*, apresentaram regulados positivamente os genes *CCL2*, *CSF2*, *CXCL10*, *IFNB1*, *IL6*, *CXCL8*, *IRF1*, *NFKBIA*, *TLR4* e *TNF*. Os genes regulados negativamente foram *CD14*, *IL12A*, *LY96* e *TLR9*. Após 48h foram regulados positivamente os genes *CCL2*, *CD14*, *CD180*, *IL6* e *TNF*, e negativamente os genes *IFNB1* e *IL10* (Figura 43).

Figura 43 - Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias dos receptores do tipo Toll em células PHK infectadas por *M. hominis*.



Legenda: A) 1 hora de infecção por *M. hominis* e B) 48 horas de infecção por *M. hominis*. Regulação positiva (verde) e regulação negativa (vermelho) de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0,05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism).

Podemos concluir que a infecção por *M. hominis* leva a alterações na expressão dos genes relacionados à via de TLR, e que essa alteração varia de acordo com o tempo de infecção e ao tipo celular, com alguns destaques:

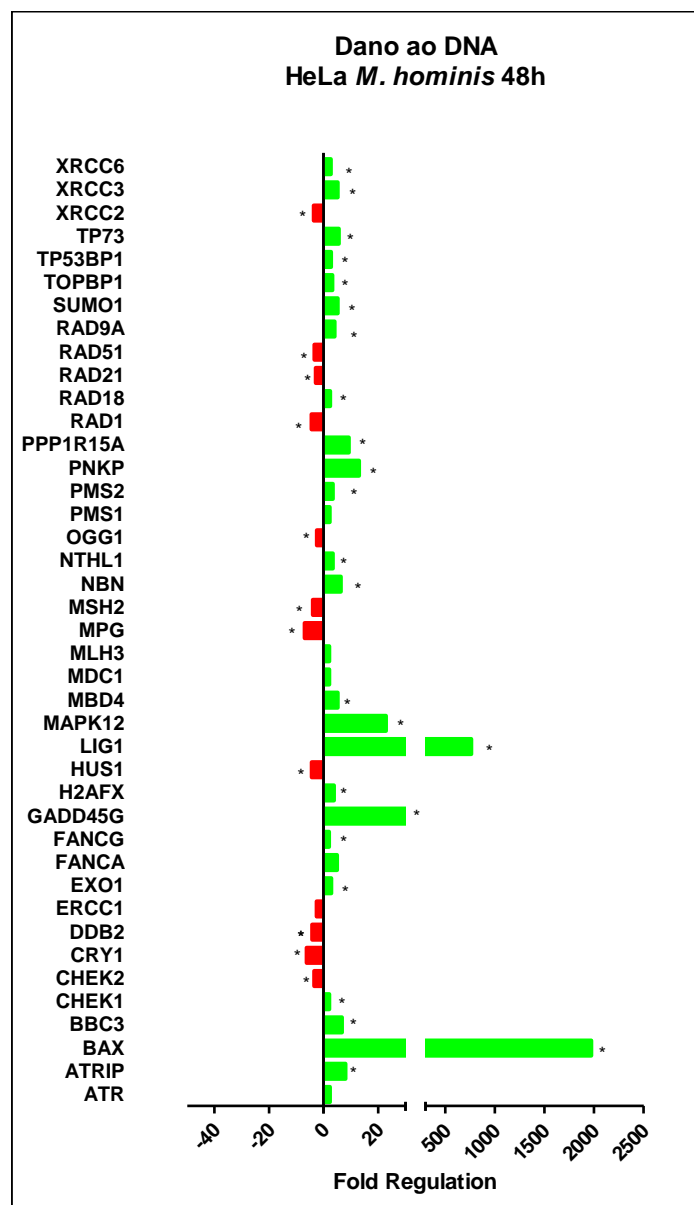
- Nas células SiHa houve alterações na expressão de PTGS2, TLR8, TLR9, TLR5, TLR7, INFG, TNF e NFKBIA.
- Entre as células PHK, foi observada alterações na expressão de diversos genes, como por exemplo TLR4, CD14, LY96, TLR9 e CD180.
- Nas células HeLa, destaca-se que a infecção por *M. hominis* após 48 horas levou a diminuição global de diversos genes relacionados à via de TLR, com destaque para TLR4, TLR6, TLR8, HSPD1, IFNA, HMGB1 e SARM1. A diminuição da expressão do gene HSPD1 e das proteínas HSP70 e HPS27 em HeLa evidenciam um mecanismo de evasão imunológica de *M. hominis*;
- Alterações na expressão de TLR intracelulares, como TLR 5, TLR 7, TLR8 e TLR9 pelas diferentes linhagens indicam a influência de *M. hominis* nos sistemas endossômicos;

5.7.3 Análise da expressão dos genes relacionados à via de dano ao DNA

As análises da expressão dos genes relacionados às vias de dano ao DNA foram feitas a partir de culturas de células SiHa, HeLa e PHK infectadas ou não por *M. hominis* após 1 e 48 horas de infecção. Só foram consideradas para as análises estatísticas aqueles genes cujas diferenças na expressão foram duas vezes maiores ou menores entre as três linhagens celulares.

SiHa apresentou apenas um gene regulado positivamente após 1h de infecção por *M. hominis*, o gene *TP73* (Fold Regulation = -2,69, dado não representado em figuras), com diferença estatisticamente significativa entre o grupo infectado e o grupo controle. Não apresentou diferença na expressão de nenhum dos genes após 48 horas de infecção. HeLa não apresentou diferença na expressão de nenhum gene relacionado às vias de dano ao DNA após 1 hora de infecção por *M. hominis* e, após 48 horas de infecção, apresentou 24 genes regulados positivamente (*ATRIP*, *BAX*, *BBC3*, *CHEK1*, *EXO1*, *FANCG*, *GADD45G*, *H2AFX*, *LIG1*, *MAPK12*, *MBD4*, *NBN*, *NTHL1*, *PMS2*, *PNKP*, *PPP1R15A*, *RAD18*, *RAD9A*, *SUMO1*, *TOPBP1*, *TP53BP1*, *TP73*, *XRCC3* e *XRCC6*) e 11 regulados negativamente (*CHEK2*, *CRY1*, *DDB2*, *HUS1*, *MPG*, *MSH2*, *OGG1*, *RAD1*, *RAD21*, *RAD51* e *XRCC2*) (Figura 44).

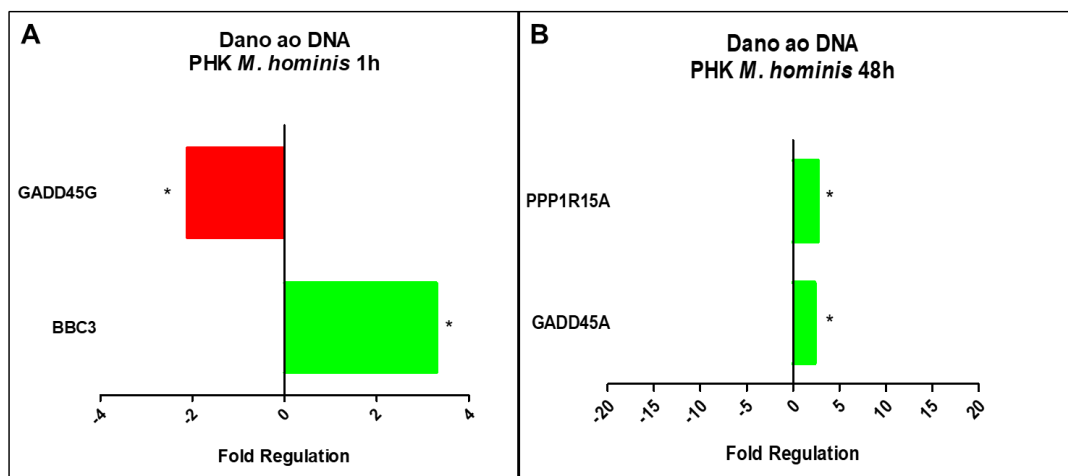
Figura 44 – Análise da expressão gênica dos genes relacionados às vias de danos ao DNA em células HeLa infectadas por *M. hominis* por 48 horas.



Legenda: Regulação positiva (verde) e regulação negativa (vermelho) de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0,05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism).

A figura 45 mostra que as células PHK apresentaram apenas um gene regulado positivamente (*BBC3*) e um negativamente (*GADD45G*) após 1 hora de infecção por *M. hominis* e apenas dois regulados positivamente (*GADD45A* e *PPP1R15A*) após 48 horas de infecção.

Figura 45 – Análise de expressão gênica dos genes relacionados às vias de danos ao DNA em células PHK infectadas por *M. hominis*.



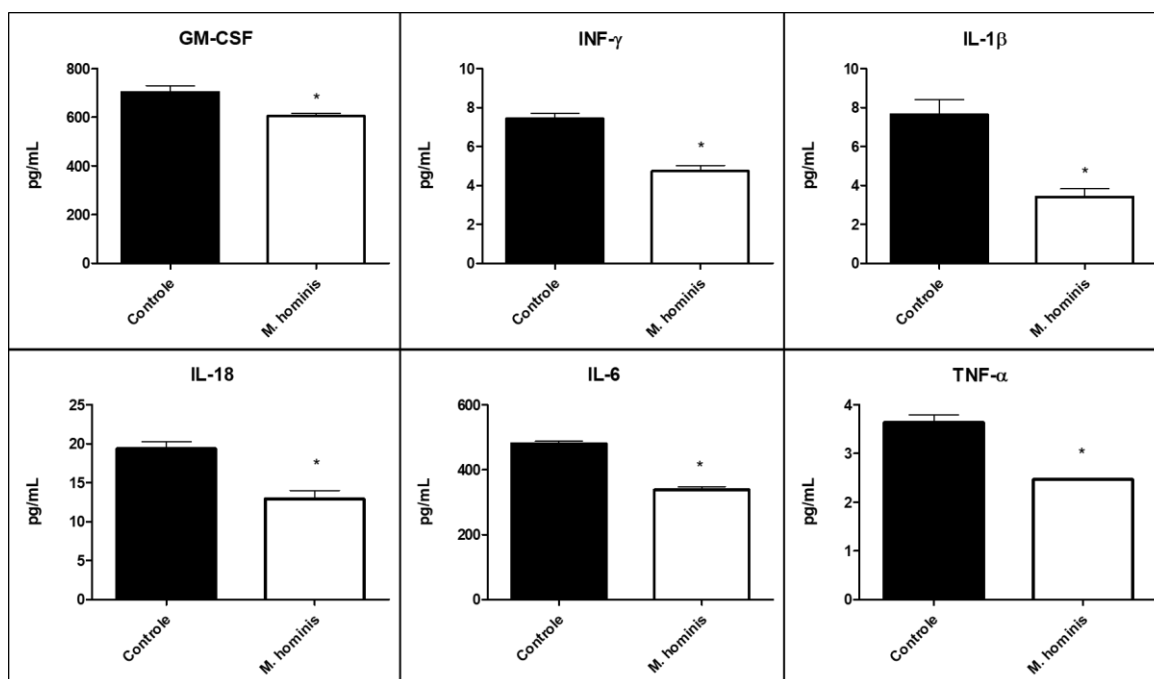
Legenda: A) 1 hora de infecção por *M. hominis* e B) 48 horas de infecção por *M. hominis*. Regulação positiva (verde) e regulação negativa (vermelho) de genes ligados às vias de ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Significância estatística ($p < 0,05$) é representada por asterisco (*) (teste não paramétrico Mann-Whitney - One-tailed test, GraphPad Prism).

Conclui-se que a infecção por *M. hominis* é capaz de alterar os níveis de expressão de genes relacionados às vias de dano ao DNA de maneira distinta entre as diferentes linhagens celulares, com maior efeito em HeLa e em PHK.

5.8 Quantificação de citocinas produzidas pelas linhagens celulares

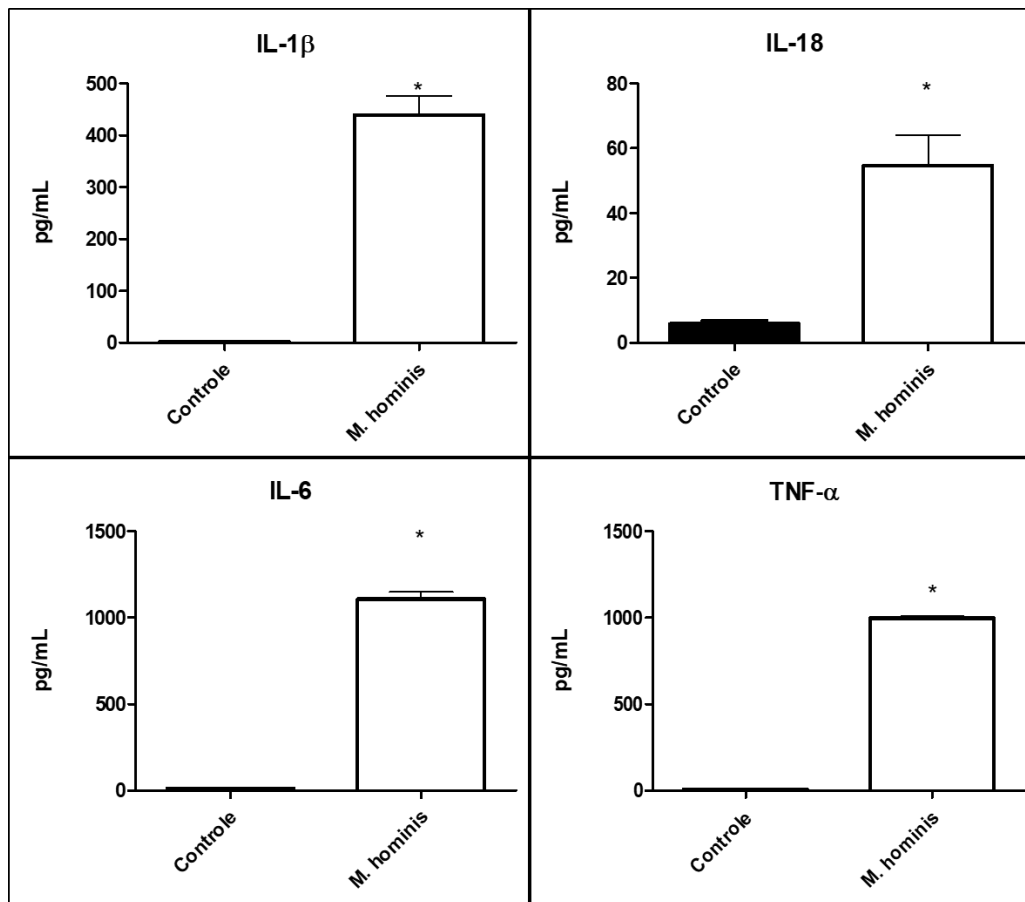
As figuras 46, 47 e 48 representam as citocinas liberadas por SiHa, HeLa e PHK que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as células que foram infectadas e as não infectadas por *M. hominis* após 48 horas de infecção. As citocinas foram normalizadas pelo total de proteínas obtidos dos extratos celulares, tomando como base 1000 μg . Foi verificado uma diminuição das citocinas GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF- α liberadas por SiHa após 48 horas de infecção por *M. hominis* (Figura 46). Entre as células HeLa infectadas pelo micro-organismo, houve aumento na liberação de IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF- α (Figura 47). Por fim, foi observado que PHK infectado também apresentou maior liberação de INF- γ , IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF- α (Figura 48).

Figura 46 – Quantificação de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura de células SiHa após 48 horas de infecção por *M. hominis*.



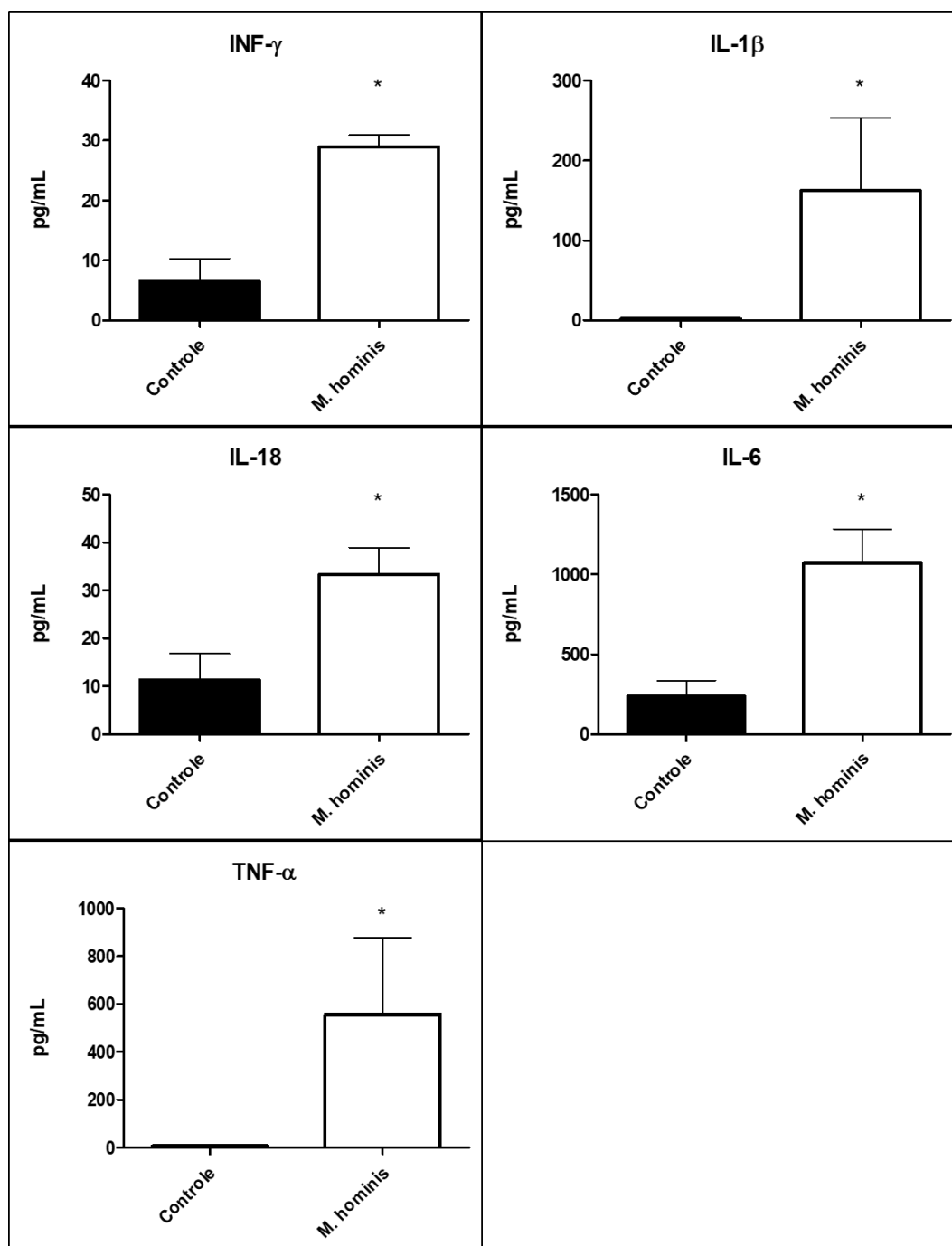
Legenda: Dados expressos pela mediana \pm Desvio Padrão. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre o grupo infectado e o grupo controle (Mann-Whitney unicaudal, p-valor \leq 0,05).

Figura 47 – Quantificação de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura de células HeLa após 48 horas de infecção por *M. hominis*.



Legenda: Dados expressos pela mediana \pm Desvio Padrão. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre o grupo infectado e o grupo controle (Mann-Whitney unicaudal, p-valor \leq 0,05).

Figura 48 – Quantificação de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura de células PHK após 48 horas de infecção por *M. hominis*.



Legenda: Dados expressos pela mediana \pm Desvio Padrão. Os asteriscos representam diferença estatisticamente significativa entre o grupo infectado e o grupo controle (Mann-Whitney unicaudal, p-valor \leq 0,05).

Verifica-se, portanto, que a infecção por *M. hominis* é capaz de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias liberadas por SiHa, ao passo que leva ao aumento das mesmas citocinas em HeLa e em PHK.

6 DISCUSSÃO

Mycoplasma genitalium (MG), *M. hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *U. parvum* (UP) estão entre as espécies de *Mollicutes* que demandam maior atenção devido à sua elevada frequência no trato feminino e masculino humano e aos efeitos que podem causar, mesmo que estejam presentes em indivíduos assintomáticos (TAYLOR-ROBINSON, 2017; YE; SONG; ZENG; LI *et al.*, 2018). Estudos epidemiológicos mostram que os ureaplasmas podem ser detectados no colo do útero ou na mucosa vaginal de 40 a 80% de mulheres sexualmente ativas assintomáticas, enquanto MH e MG foram encontrados em apenas 20-50% e 0-5%, respectivamente (TAYLOR-ROBINSON, 2017). Sua presença na região vaginal, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, e seu potencial patogênico são influenciados pela idade, atividades hormonal, sexual e gravidez (FOSCHI; SALVO; D'ANTUONO; GASPARI *et al.*, 2018). Embora muitos estudos tenham abordado o papel destes micro-organismos na microbiota vaginal, muitos aspectos ainda precisam ser elucidados, principalmente a respeito da associação com diferentes condições clínicas. Estudos apontam que essa associação com doenças é dose-dependente, podendo influenciar o sistema imune do hospedeiro (BISSESSOR; TABRIZI; BRADSHAW; FAIRLEY *et al.*, 2016; JIANG; YAN; JI; WANG *et al.*, 2014).

No presente estudo, antes de realizar os ensaios de infecção nas linhagens celulares de SiHa, HeLa e PHK, foram realizadas tentativas de padronizar a obtenção e a quantificação do inóculo de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum*. Existem controvérsias na literatura sobre qual seria a técnica mais aceita e mais reprodutível para a mensuração de micoplasmas viáveis. Devido às propriedades adesivas dos micoplasmas, ambos os resultados estimam a quantidade de micoplasma nas culturas. Alguns estudos retratam que os resultados da CCU são mais relevantes, uma vez que a capacidade de crescimento de mollicutes em meio líquido é maior do que no meio sólido, favorecendo a metodologia em relação a UFC (STEMKE; ROBERTSON, 1982). Para micro-organismos como os ureaplasmas, a contagem das colônias não se aplica devido ao diminuto tamanho das colônias (RAZIN; TULLY, 1995). No entanto, outros estudos demonstraram uma boa reprodutibilidade (MOHADJER; KAFTARIANS, 1973) e que a técnica de contagem de colônias deve ser utilizada ao invés da CCU, uma vez que esta é altamente passível de erros experimentais (RAZIN, 2012; RAZIN; TULLY, 1995). No presente estudo, a técnica da UFC apresentou melhor reprodutibilidade, e por isso, foi a escolhida para a quantificação dos micro-organismos.

Para obtenção dos inóculos, foram realizadas técnicas as mais reprodutíveis possíveis para alcançar condições padronizadas de crescimento. Assim, para não incompatibilizar a adaptação

da estirpe e o seu desenvolvimento pós-infecção nas culturas celulares, foram realizadas tentativas de utilização de cultivos frescos, ou seja, não congelados previamente. Contudo, devido às dificuldades inerentes ao crescimento dos mollicutes, por serem fastidiosos e nutricionalmente exigentes (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003), isso dificultou o seguimento do trabalho. Outro problema encontrado foi para estimar a quantidade exata de micro-organismos capazes de causar alterações nas células, com a finalidade de estabelecer uma correlação entre a carga e a capacidade de causar danos ao hospedeiro. Como a quantificação por UFC/mL só era estabelecida após as infecções, e devido as dificuldades entre cada cultivo, não era possível estabelecer com precisão qual era a quantidade de micro-organismos no momento da infecção, mesmo seguindo rigorosamente as mesmas condições de cultivo entre as replicatas. Devido a este fato, foram utilizados inóculos congelados para os ensaios de infecção em célula com *M. hominis*, pois assim era possível estimar a quantidade dos micro-organismos no momento da infecção. Essa dificuldade em obter inóculos de forma reprodutível também foi encontrada por Waites et al. (2012) em um estudo que objetivou estabelecer e demonstrar a reprodutibilidade interlaboratorial para ensaio de suscetibilidade a antimicrobianos por meio da Concentração Mínima inibitória (CIM) para *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis* e *U. urealyticum*. Parte da dificuldade e da incapacidade em obter um consenso suficiente entre os resultados que encontraram foi atribuído, em parte, à natureza exigente desses micro-organismos e a relativa dificuldade em obter um inóculo preciso e reprodutível (WAITES; DUFFY; BÉBÉAR; MATLOW et al., 2012). Isso evidencia que as condições de crescimento e quantificação de micro-organismos ainda demonstram ser um desafio no campo de estudo dos *Mollicutes*.

Mesmo diante das dificuldades encontradas, foi verificado o efeito de diferentes doses de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* sobre a viabilidade de células SiHa, HeLa e PHK após 72 horas de infecção. Foi observado que o efeito da infecção por *M. genitalium* sobre as três linhagens celulares foi dose-dependente, sendo que maiores cargas do micro-organismo causaram diminuição mais significativa no número de células, principalmente em células HeLa. Recentemente, maior interesse tem sido dado a *M. genitalium* como patógeno sexualmente transmissível em relação a carga bacteriana e inflamação do trato urogenital em mulheres, especialmente nos casos de cervicite (LIS; ROWHANI-RAHBAR; MANHART, 2015; MCGOWIN; ANDERSON-SMITS, 2011; MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009; TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011). A carga de *M. genitalium* também foi associada com maior resistência ao tratamento com macrolídeos, bem como com nas proctite em homens que fazem sexo com homens (BISESSOR; TABRIZI; BRADSHAW; FAIRLEY et al., 2016; BISESSOR; TABRIZI; TWIN; ABDO et al., 2015;

MURRAY; DANIELEWSKI; BODIYABADU; MACHALEK *et al.*, 2019; WALKER; FAIRLEY; BRADSHAW; TABRIZI *et al.*, 2013).

Ao analisar *M. hominis*, todas as doses utilizadas, inclusive doses menores quando comparadas aos outros mollicutes, apresentaram efeito significativo sobre a quantificação das células HeLa, PHK e SiHa, mesmo que o efeito nesta última linhagem tenha sido menos pronunciado. Devido a este fato, *M. hominis* foi o micro-organismo com maior potencial de causar diminuição no número total de células quando comparado com as outras três espécies de *Mollicutes*. *M. hominis* foi associado à vaginose bacteriana (VB), uma condição clínica caracterizada pelo esgotamento de lactobacilos vaginais, colonização e o aumento da carga bacteriana de outras espécies de bactérias anaeróbias facultativas ou estritamente anaeróbias (COX; WATT; MCKENNA; COYLE, 2016; SHIPITSYNA; ROOS; DATCU; HALLÉN *et al.*, 2013). Outros estudos mencionam que mulheres com VB apresentam *M. hominis* mais frequentemente e também possuem cargas maiores deste micro-organismo do que as mulheres negativas para VB (COX; WATT; MCKENNA; COYLE, 2016; FOSCHI; SALVO; D'ANTUONO; GASPARI *et al.*, 2018; TAYLOR-ROBINSON, 2017). O papel dos outros *Mollicutes* utilizados neste estudo na patogênese da VB é menos consistente e considerado controverso (FOSCHI; SALVO; D'ANTUONO; GASPARI *et al.*, 2018; TAYLOR-ROBINSON, 2017). Estudos têm relacionado a VB com o desenvolvimento de lesões cervicais, fator importante na relação com os tipos celulares infectados pelo micro-organismos no presente estudo (GILLET; MEYS; VERSTRAELEN; VERHELST *et al.*, 2012).

U. urealyticum apresentou efeito dose dependente sobre alterações nas células PHK, sendo que as maiores cargas causaram diminuição significativa no desenvolvimento dessas células, mas não nas células SiHa e HeLa. O efeito da infecção por *U. parvum* para SiHa, PHK e HeLa foi dose-dependente. Poucos estudos foram encontrados que relacionem a carga de ureaplasmas com desordens no aparelho genital, principalmente com lesões precursoras do câncer cervical (XIAOLEI; TAOT; ZONGLI; HONGYING, 2014). Um recente trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou que mulheres com lesões de colo de útero apresentavam maior carga de *U. parvum* (AMORIM; MARQUES; CAMPOS; LOBÃO *et al.*, 2017). Liu *et al.* (2014) relacionaram a carga de *U. parvum* e *U. urealyticum* com a presença de cervicite (LIU; CAO; ZHAO; ZHAO *et al.*, 2014). Yoshida *et al.* (2007) encontraram associação entre maior carga de *U. urealyticum* e a presença de UNG-NC em homens (YOSHIDA; DEGUCHI; MEDA; KUBOTA *et al.*, 2007). Deguchi *et al.* (2014) verificaram uma possível associação entre a carga de *U. parvum* e o desenvolvimento de inflamação em homens com sintomas de UNG-NC (DEGUCHI; YOSHIDA; MIYAZAWA; YASUDA *et al.*, 2004; SHIMADA; ITO; MIZUTANI; SUGAWARA *et al.*, 2014).

Poucos estudos focalizam a importância de se verificar a carga dos *Mollicutes* nas diferentes infecções urogenitais. A simples presença do micro-organismo não está relacionada com o desenvolvimento de doenças. A detecção e a quantificação de *Mollicutes*, portanto, tem potencial para monitorar e tratar pacientes com antibióticos (HORNER; DONDERS; CUSINI; GOMBERG *et al.*, 2018; MURRAY; DANIELEWSKI; BODIYABADU; MACHALEK *et al.*, 2019).

No presente estudo, observamos também os efeitos dos micro-organismos sobre a curva de crescimento das três linhagens celulares. Além disso, para observar um efeito induzido pelo HPV, foram realizados experimentos com células PHK transduzidas com vetores pLXSN vazio (PHK pLXSN Ø) e expressando os oncogenes E6 e E7 de HPV 16 (PHK pLXSN E6/E7 HPV16).

Existem poucos relatos na literatura evidenciando o efeito citopático das espécies de *Mollicutes* em infecções experimentais *in vitro* (HAYES; LI; WEAR; LO, 1996), principalmente envolvendo queratinócitos. A determinação da curva de crescimento de linhagens de células após infecção experimental por mollicutes é pouco explorada. Estes micro-organismos são também mencionados na literatura com frequência associados à contaminações indesejadas de linhagens celulares (HAY; MACY; CHEN, 1989).

Ao analisar a curva de crescimento das linhagens celulares, verifica-se a capacidade das células de proliferar ou não mediante a infecção por *Mollicutes*. Observamos que a infecção por *M. hominis* levou a alterações nas curvas de crescimento das células SiHa e HeLa. Mesmo com a diminuição no número de células, estas continuaram vivas, demonstrando alterações nos respectivos tempos de dobramento celulares (DT). Estas variações podem ser devido às alterações na modulação do ciclo celular. Em relação aos queratinócitos (PHK, PHK pLXSN Ø e PHK pLXSN HPV16 E6/E7), não foram quantificadas células viáveis após a infecção, demonstrando um efeito citopático de *M. hominis* para essas linhagens independentemente da presença dos oncogenes E6/E7 de HPV16. Esses efeitos foram refletidos também no ensaio clonogênico, em que pode ser observada ausência da formação de colônias nas células PHK previamente infectadas. Houve também a diminuição do número de colônias em SiHa e HeLa após 15 dias de infecção. Esse é o primeiro estudo que avalia o efeito de *M. hominis* em queratinócitos primários humanos provenientes de prepúcio. Zhang *et al.* (2000), avaliaram o efeito de diferentes micoplasmas, inclusive *M. hominis*, sobre a cinética de desenvolvimento de células epiteliais da próstata e do colo do útero humanas imortalizadas com os genes E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 18 (HPV 18). No estudo, não observaram efeitos significativos na cinética de crescimento após 72 h de infecção, mas houve alteração na expressão de citocinas das duas linhagens celulares. Os autores observaram que os efeitos variaram com o tipo de célula hospedeira e as espécies de micoplasmas infectantes, o que corrobora com os nossos resultados

(ZHANG; WEAR; LO, 2000). O efeito citopático de *M. hominis* também pode apresentar variabilidade conforme a cepa utilizada, como visto em cultura de células primárias de menisco de coelho (fibrocondrócito – FcrC) (NASCIMENTO; FIGUEIREDO; TIMENETSKY, 2002). Em estudo recente realizado por Henrich et al. (2013) foi demonstrado que *M. hominis* tem a capacidade de aderir e invadir células HeLa em diferentes tempos de infecção, isso justifica alterações no efeito citopático ao longo do tempo escolhido. Foi observado que a infecção pela cepa FBG de *M. hominis* possui a capacidade de afetar a resposta imune e vias de transdução de sinal, assim como possui a capacidade de modular a expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento, do ciclo celular e nas vias de morte, assim como nosso trabalho (HENRICH; KRETZMER; DEENEN; KÖHRER, 2017; HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER et al., 2013). Também foi observado que o parasita *Trichomonas vaginalis* colonizado naturalmente por *M. hominis* possui um o efeito citopático mais pronunciado em células epiteliais vaginais quando comparado com células infectadas apenas com *T. vaginalis* (DESSI; DELOGU; EMONTE; CATANIA et al., 2005; VANCINI; PEREIRA-NEVES; BOROJEVIC; BENCHIMOL, 2008).

A infecção por *M. genitalium* em SiHa e HeLa não ocasionou diminuição do número de células nos primeiros dias de infecção. Entretanto, após 120h e 168h, respectivamente, foi observado menor número de células quando comparado ao controle. Alterações quando ao tempo de duplicação das células foram discretas. Este efeito também foi observado no ensaio clonogênico, obtendo-se menor número de colônias para a célula SiHa infectada, mas não foram observadas diferenças com as células HeLa. Em PHK, a infecção por *M. genitalium* diminuiu o número de células aparentemente por retardar o tempo de duplicação, principalmente até 96 horas. No entanto, após este período a célula voltou a se duplicar. Podemos observar que no ensaio clonogênico a dose utilizada de *M. genitalium* eliminou todas as células, por isso não foram observadas colônias celulares após 15 dias de infecção. Nos queratinócitos transduzidos (PHK pLXSN Ø e PHK pLXSN HPV16 E6/E7) a diminuição na proliferação foi maior. Entretanto, observou-se a recuperação na replicação celular a partir de 120 horas de infecção. Podemos inferir que o efeito de *M. genitalium* é célula dependente, com efeito mais tardio de infecção. McGowin et al. (2012) também observaram que *M. genitalium* pode estabelecer infecção prolongada de células epiteliais endocervicais humanas, sem destruir as células, resultando em produção crônica de citocinas pró-inflamatórias e aumento da estimulação da via dos receptores Toll-like (TLR). Viram que, apesar da estimulação persistente da liberação de citocinas, não foi observada citotoxicidade nas células hospedeiras, exceto ao utilizar altas cargas de *M. genitalium*, sugerindo que a infecção persistente ocorre com dano direto mínimo ao epitélio. Existe a hipótese de que a secreção crônica de quimiocinas, com recrutamento de leucócitos para o epitélio, poderia causar

sequelas inflamatórias significativas. Desta maneira, a infecção crônica por *M. genitalium* pode contribuir no desenvolvimento ou agravamento de outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (MCGOWIN; ANNAN; QUAYLE; GREENE *et al.*, 2012; MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009). De fato, o potencial dos mollicutes em aderir e invadir as células do hospedeiro, contribui na evasão da resposta imune favorecendo o estabelecimento de infecção crônica (MCGOWIN; POPOV; PYLES, 2009). Zuo *et al.* (2018) verificaram que proteínas de membrana associada a lipídios (LAMP) de *M. genitalium* não foram capazes de alterar a viabilidade de células HeLa em baixas doses, mas foram capazes de induzir a parada do ciclo celular na fase G1 nas células HeLa e inibir a apoptose (ZUO; SUN; YU; YOU *et al.*, 2018). Isso deixa claro um dos *hallmarks* da infecção por cepas patogênicas de *Mollicutes*: uma infecção com característica persistente e crônica (BASEMAN; LANGE; CRISCIMAGNA; GIRON *et al.*, 1995). Apesar de não terem sido continuados os trabalhos com *M. genitalium* no presente estudo, ressalta-se a importância de avaliar o efeito da infecção pelo micro-organismo nas linhagens celulares citadas.

No presente estudo, *U. urealyticum* e *U. parvum* diminuíram a proliferação das células quando comparado com o grupo controle em SiHa após 96 e 120h. O tempo de duplicação foi calculado entre 24-96h e não foram observadas alterações. Nas células HeLa, o DT foi alterado de maneira pouco significativa. Nas células PHK, variações quanto ao número de células viáveis foram mais significativas com a infecção por *U. parvum*. No ensaio clonogênico foi observado que *U. urealyticum* causou a diminuição do número de colônias em SiHa, HeLa e PHK. Contudo, em PHK o efeito foi mais significativo pela infecção por *U. parvum*. Com relação às infecções em queratinócitos transduzidos, *U. urealyticum* apresentou efeito mais significativo entre as células transduzidas com o vetor expressando E6/E7 de HPV 16, mas sem diferenças nas células com vetor vazio. Apesar dos efeitos moderados dos ureaplasmas nas culturas celulares, observou-se a diminuição na proliferação das células. Em estudo realizado por Shang *et al.* (1999), utilizando células espermatogênicas de ratos da raça Han infectadas com *U. urealyticum*, observou-se que houve mais apoptose entre as células infectadas por *U. urealyticum* (SHANG; HUANG; XIONG; XU *et al.*, 1999). Li *et al.* (2002) também observaram que células epiteliais pulmonares tipo II e macrófagos apresentaram altas taxas de apoptose quando infectados por *U. urealyticum* (LI; CHEN; BRAUNER; ZHENG *et al.*, 2002).

Com ureaplasmas, ocorre um paradoxo maior, porque *U. urealyticum* e *U. parvum* estão presentes em indivíduos com ou sem distúrbios genitais (GDOURA; KCHAOU; CHAARI; ZNAZEN *et al.*, 2007; GLASS; LEFKOWITZ; GLASS; HEINER *et al.*, 2000; HARADA; TANAKA; KOMORI; TSUJI *et al.*, 2008; UUSKÜLA; KOHL, 2002). Os ureaplasmas interagem e colonizam a superfície mucosa do trato urogenital se ligando à membrana plasmática do hospedeiro, causando danos

celulares pela produção de radicais superóxido. As fosfolipases de ureaplasmas podem interagir com a membrana plasmática da célula hospedeira, sendo um fator de virulência significativo (DE SILVA; QUINN, 1991; KONDRATYEVA; NEYMARK; AIDAGULOVA; TARANINA *et al.*, 2013). Outro fator de patogenicidade é a liberação de amônia pelos ureaplasmas, produto do metabolismo da ureia. A amônia é tóxica para a célula do hospedeiro, podendo aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio pela célula. Os ureaplasmas podem produzir hemolisinas, proteínas com caráter hemolítico e citotóxico (POLLACK; WILLIAMS; MCELHANEY, 1997; RAZIN; HAYFLICK, 2010). Entretanto, mais estudos devem ser realizados para compreender o processo infeccioso por ureaplasmas, principalmente analisando a infecção de caráter crônico e persistente.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de dose infectante, ciclo celular e ensaio clonogênico, foi estabelecido que *M. hominis* apresentou alterações mais significativas nas linhagens celulares de SiHa, HeLa e PHK. Estes resultados contribuíram para a condução dos outros experimentos utilizando apenas com este mollicute.

Infecções por espécies de mollicutes foram relacionadas à desregulação do ciclo celular e morte celular programada durante a apoptose (FENG; TSAI; RODRIGUEZ; LO, 1999). Alguns estudos vinculam a inflamação causada pela infecção crônica por *M. hominis* à transformação celular, instabilidade genômica, alterações na expressão de p53, resistência à apoptose e desenvolvimento de câncer de próstata (BARYKOVA; LOGUNOV; SHMAROV; VINAROV *et al.*, 2011; CAINI; GANDINI; DUDAS; BREMER *et al.*, 2014; KHAN; ZAKARIAH; ROLFO; ROBRECHT *et al.*, 2017; LOGUNOV; SCHEBLYAKOV; ZUBKOVA; SHMAROV *et al.*, 2008; ROGERS, 2011; SFANOS; ISAACS, 2011). Entretanto, o estudo de Zhang *et al.* (2007) mostrou que a infecção por *M. hominis* na linhagem 32D de linfoblastos de camundongos resultou na apoptose das células (ZHANG; LO, 2007). No presente estudo, foram avaliadas alterações celulares causadas por *M. hominis* na proliferação e na viabilidade de diferentes linhagens celulares. Com células SiHa, verificou-se apenas o aumento de células em Sub-G0/G1 em 6 horas de infecção, e não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos nas diferentes fases do ciclo celular. Ao avaliar possíveis alteração na expressão de genes relacionados à via de danos ao DNA, foi observado apenas o aumento de TP73, um membro da família p53, que codifica diversas isoformas da proteína p73, a qual tem sido descrita causar parada no ciclo celular e ativar vias de apoptose (JOST; MARIN; KAELIN, 1997; YAO; DI POTO; MAVODZA; OLIVER *et al.*, 2019). Esse gene também tem sido descrito por estar mais expresso nos casos de câncer cervical e ser um possível marcador de prognóstico (YE; GUO, 2019). A infecção por *M. hominis* em células HeLa e PHK resultou no aumento das populações celulares na fase Sub-G0/G1 após 6 e 48 horas de

infecção. O aumento de células nessa sub-fase caracteriza fragmentação do DNA e, conseqüentemente, morte celular por apoptose. Ao analisar as células HeLa que não foram categorizadas em Sub-G0/G1, observou-se o aumento do número de células na fase S do ciclo entre as células infectadas e diminuição em G1 e G2 após 48 horas. Ao analisar a expressão dos genes relacionados às vias de dano ao DNA, as quais podem indicar parada do ciclo celular para reparo ou evolução para apoptose, observamos um aumento da expressão dos genes relacionados à via de ATR, pois foi observado um aumento da expressão de ATR/ATRIP, HUS9, TOPBP1, TP53BP1, GADD45, CHEK1. Com relação aos genes relacionados à via de ATM, alguns foram mais expressos, como HSAFX, MDC1, SUMO1, mas outros estavam menos expressos, como CHEK 2. As vias de ATR/ATM interagem entre si, então *M. hominis* pode levar a ativação dessas vias como resposta à danos causados ou ao estresse oxidativo gerado pelo processo infeccioso (MARÉCHAL; ZOU, 2013; WANG; LI; ZHANG; GAO, 2019).

Em PHK, foi observado um aumento considerável da população celular em Sub-G0/G1, em 6 e 48 horas de infecção por *M. hominis* e aumento das células remanescentes na fase S após 6 horas e em G2 após 48h de infecção demonstram que a infecção levou a danos à célula, levando a parada do ciclo e/ou direcionamento para morte por apoptose. Essas alterações no perfil do ciclo celular devem ser levadas em consideração quando verificamos um aumento dos tempos de dobramento das células visualizados nas curvas de crescimento. Ao analisar alterações nas vias de dano ao DNA, logo após 1 hora observou-se uma aumento de BBC3 (PUMA), o qual tem efeito pró apoptótico, e uma diminuição da expressão de GADD45G (SCHMIDT; VON WOEDTKE; BEKESCHUS, 2016). GADD45 é um gene induzido por resposta a danos ao DNA e tem como função regular o ciclo celular entre a fase G1 e S, causando interrupção do ciclo (FORNACE; NEBERT; HOLLANDER; LUETHY *et al.*, 1989; SMITH; CHEN; ZHAN; BAE *et al.*, 1994). Entretanto, no presente estudo, observou-se o aumento na expressão de GADD45 e PPP1R15A após 48 horas. PPP1R15A (*protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A*), também conhecido como GADD34, também está envolvida na resposta a danos ao DNA. Assim, a interrupção do ciclo celular e o aumento da expressão proteica está relacionado com indução à apoptose e com regulação da resposta imune para prevenir dano tecidual em infecções bacterianas (ITO; TANAKA; OSHINO; OKADO *et al.*, 2016; ZHAN; LORD; ALAMO; HOLLANDER *et al.*, 1994). Essas diferenças encontradas entre as linhagens demonstram que o efeito da infecção pelo micro-organismo é célula-dependente.

Estudos apontam que a interferência dos *Mollicutes* sobre o ciclo celular está envolvida, provavelmente, pela ação de ciclomodulinas. As ciclomodulinas têm a capacidade de alterar o funcionamento normal de vários pontos de verificação durante o ciclo celular (EL-AOUAR FILHO;

NICOLAS; DE PAULA CASTRO; DEPLANCHE *et al.*, 2017a; b). O papel das ciclomodulinas bacterianas no contexto da interação hospedeiro-micróbio é questão emergente no campo de doenças infecciosas (EL-AOUAR FILHO; NICOLAS; DE PAULA CASTRO; DEPLANCHE *et al.*, 2017a; b; NOUGAYRÈDE; TAIEB; DE RYCKE; OSWALD, 2005; OSWALD; NOUGAYRÈDE; TAIEB; SUGAI, 2005; RAJALINGAM; SHARMA; LOHMANN; OSWALD *et al.*, 2008). Enquanto as estruturas e os mecanismos de ação das ciclomodulinas em *Mollicutes* são investigados, os dados referentes à análise das alterações no ciclo celular como resultado da infecção são muito escassos (FENG; TSAI; RODRIGUEZ; LO, 1999; KHAN; ZAKARIAH; ROLFO; ROBRECHT *et al.*, 2017). Foi observado que ciclomodulina CIF (cycle inhibiting fator) de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) teve a capacidade de induzir a parada na fase G2 do ciclo celular de células HeLa sem ativação da via de sinalização do ponto de verificação de danos ao DNA (TAIEB; NOUGAYRÈDE; WATRIN; SAMBA-LOUAKA *et al.*, 2006). Um outro trabalho observou que *Listeria monocytogenes*, um patógeno intracelular, ao infectar células Caco-2 (linhagem proveniente de um adenocarcinoma colorretal), induziu uma parada das células na fase S, acompanhado por uma taxa mais lenta de síntese de DNA e aumento dos níveis de quebras na fita do DNA, sugerindo que estes efeitos se deram por conta da presença de ciclomodulinas (LEITÃO; COSTA; BRITO; COSTA *et al.*, 2014). Nenhuma ciclomodulina foi descrita até o presente momento em *M. hominis*. Desta forma, os efeitos observados para *M. hominis* sobre o ciclo celular precisam ser melhor avaliados, investigando a possível existência desse fator de virulência.

Para melhor compreensão se as células apresentavam sinais de encaminhamento para a morte celular, utilizamos um kit que avalia a expressão de 35 proteínas envolvidas com a regulação do apoptose. Ao realizar a quantificação de proteínas envolvidas com as vias pró- e anti-apoptóticas produzidas por células SiHa, verificamos o aumento das proteínas pró-apoptóticas Procaspase 3, FADD, FAS, HO-1/HMOX1/HSP32 e diminuição de HO-2/HMOX2, HSP 60, Rad 17 fosforilado na serina 635 e SMAC/DIABLO. Com relação as proteínas anti-apoptóticas, encontramos aumento da expressão de Catalase e diminuição de cIAP, HSP27 e Survivina. Dessa forma, houve um equilíbrio entre a expressão de fatores pró e anti-apoptóticos, o que explica o fato de não ter sido visualizado células em apoptose na análise de células em Sub-G0/G1.

Ao verificar células HeLa infectadas por *M. hominis* após 48 horas de infecção, observamos tanto o aumento quanto a diminuição de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas quando comparado com o controle. Observamos alterações nos níveis das proteínas pró apoptóticas, com aumento de BAD, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, HSP 60 e diminuição de Pró-Caspase 3, Caspase 3 ativada, Claspina, Clusterina, Fas/TNFRSF6/CD95, HIF-1 alfa, HO-1/HMOX1/HSP32, HO-2/HMOX2, p27/Kip1, p53 fosforilado nas serinas 46 e 392, RAD 17 fosforilado na serina 635

e SMAC/DIABLO. Com relação aos fatores anti-apoptóticos, observamos aumento de Catalase e p21 e diminuição de Bcl-2, cIAP, HSP27, HSP70 e Survivina. Com relação à PHK, houve um aumento da expressão tanto de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Pró-Caspase 3, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, Fas/TNFRSF6/CD95, HO-1/HMOX1/HSP32, HO-2/HMOX2, HSP 60, HTRA2/Omi, PON 2, p27, p53 fosforilado nas serinas 15 e 46 e SMAC/DIABLO) quanto de fatores anti-apoptóticos (Bcl-2, Catalase, cIAP 1, HSP 27, HSP 70, p21 e Survivina). Entretanto, ao realizar um balanço, houve uma predominância da expressão de proteínas pró-apoptóticas, principalmente de proteínas relacionadas à via extrínseca, como TRAIL e Fas, o que justifica os dados encontrados de morte celular nos ensaios de curva de crescimento, ensaio clonogênico e Sub-G0/G1. É importante ressaltar que *M. hominis* utiliza arginina para obtenção de ATP e a degradação da arginina pode ser um fator que causa a apoptose das células infectadas. Às vezes, a depleção de um nutriente específico, como a colina, pode desempenhar um papel importante na indução da apoptose das células infectadas (BEN-MENACHEM; MOUSA; BRENNER; PINTO *et al.*, 2001). A depleção de arginina pode levar a inibição da via de mTOR, ativando indiretamente vias de dano ao DNA, ATM/ATR, o que também pode explicar a parada do ciclo celular e indução de apoptose das células com alta carga do micro-organismo (WANG; LI; ZHANG; GAO, 2019). Ainda sobre o metabolismo da arginina, a desaminase de micoplasmas que utilizam arginina hidrolisa L-arginina em L-citrulina e NH₃. Este último é imediatamente convertido em amônia, o que aumenta o pH no meio de cultura. Amônia e pH aumentado podem ser prejudiciais às células. Alterações significativas do pH no meio de cultura não apenas inibem o crescimento celular, mas também são tóxicas para as células, causando a morte celular programada (BUZAŃSKA; ZABŁOCKA; DYBEL; DOMAŃSKA-JANIK *et al.*, 2000; THATTE; RHEE; ZAGARINS; TREANOR *et al.*, 2004).

Outro mecanismo para a indução de apoptose por micoplasmas é aumentar a sinalização apoptótica por meio de interação específica de micoplasmas com receptores da superfície celular ou alteração das vias de sinalização de apoptose (ZHANG; LO, 2007). A infecção micoplasmática das células HeLa começa com a cito-adesão, a qual é mediada por cito-adesinas, como P50/Vaa, P60/P80 e OppA (HENRICH; HOPFE; KITZEROW; HADDING, 1999; HOPFE; DAHLMANN; HENRICH, 2011; HOPFE; HENRICH, 2008). OppA é um oligopeptídeo permease, e é descrito como a principal ATPase na superfície das células de micoplasma, e possui a capacidade de induzir a liberação de ATP do hospedeiro e de hidrolisá-lo, demonstrando que sua atividade leva à indução de apoptose em HeLa (HENRICH; HOPFE; KITZEROW; HADDING, 1999; HOPFE; DAHLMANN; HENRICH, 2011; HOPFE; HENRICH, 2008). Este fenômeno está bem correlacionado com a hipótese de um patógeno colonizador extracelular que leva à morte celular

por apoptose, como observado no nosso trabalho. Além da capacidade de se aderir firmemente às células do hospedeiro, *M. hominis* também possui a capacidade de invadir células HeLa e também espermatozoides (DÍAZ-GARCÍA; HERRERA-MENDOZA; GIONO-CEREZO; GUERRA-INFANTE, 2006; HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER et al., 2013; TAYLOR-ROBINSON; DAVIES; SARATHCHANDRA; FURR, 1991). O papel de *M. hominis* na modulação celular foi visto por Hopfe et al (2013), os quais realizaram um modelo de infecção por *M. hominis* cepa FBG em células HeLa por 4h, 48h e 2 semanas e avaliaram o transcriptoma dessas células. Verificaram a adesão de *M. hominis* na superfície celular de HeLa logo após 4 horas de infecção (pi). Quatro horas após a infecção, 41 genes apresentaram uma expressão aumentada, sendo que 66% (27/41) pertenciam a um dos três sistemas celulares: proteínas de choque térmico (heat-shock protein - HSP), sistema imunológico ou regulação do ciclo celular, semelhante aos achados no presente estudo (HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER et al., 2013). Lipoproteínas diaciladas presentes na membrana plasmática de *Mollicutes* tem sido relacionadas iniciar resposta inflamatória via TLR2 e TLR6 ativando o fator transcricional como um evento inicial, mas também pode iniciar a apoptose como um evento mais tardio (HE; YOU; ZENG; YU et al., 2009; ZUO; SUN; YU; YOU et al., 2018; ZUO; WU; YOU, 2009).

Foi observado no presente estudo um aumento da quantificação de catalase em SiHa, HeLa e PHK, o que pode ser indício da tentativa da célula de combater um estresse oxidativo causado pela infecção por *M. hominis*. Em um estudo realizado por Chen et al. (2005) foi verificado que o nível de H_2O_2 no corrimento vaginal coletado de pacientes com vaginose bacteriana era aproximadamente dez vezes maior do que o de mulheres saudáveis, sugerindo um ambiente de estresse oxidativo. Os autores verificaram que após tratamento com metronidazol e vitamina C os níveis da substância se equipararam com o controle. A catalase é uma enzima que degrada o H_2O_2 tóxico catalisando sua decomposição em O_2 e H_2O . Entretanto, nas mulheres com vaginose bacteriana a atividade da catalase estava diminuída (CHEN; ZHANG; ZHANG; XIE, 2015). Espécies de *Mollicutes* produzem peróxido de hidrogênio e outros produtos relacionados ao estresse oxidativo (MILES; TAYLOR; VARSANI, 1991). Foi sugerido que a patogênese da micoplasmose compreende a seguinte sequência de eventos: (a) adesão dos micoplasmas às células hospedeiras; (b) geração de superóxido e peróxido de hidrogênio pelos micro-organismos e sua introdução nas células hospedeiras; (c) inibição irreversível da catalase da célula hospedeira pelo acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio; e (d) dano oxidativo aos constituintes celulares vitais (ALMAGOR; KAHANE; YATZIV, 1984; ALMAGOR; YATZIV; KAHANE, 1983; NUNOYA; TAJIMA; YAGIHASHI, 1987; SUN; XU; WANG; SHEN et al., 2008; VITULA; PECKOVA; BANDOUCHOVA; POHANKA et al., 2011). A adição de catalase no meio de cultura de *M.*

pneumoniae aumenta o seu crescimento, uma vez que este micro-organismo, assim como outros *Mollicutes*, não possui aparato enzimático para superóxido dismutase e nem para catalase, devendo existir um equilíbrio entre a produção de peróxido e o seu crescimento (SIMMONS; DYBVIG, 2015). Como *M. hominis* produz amônia como produto do seu metabolismo, foi bem estabelecido que o estresse oxidativo está fortemente associado à toxicidade da amônia e é caracterizado por um excesso de produção de ROS/RNS ou comprometimento de sua desintoxicação por mecanismos endógenos. Durante essa condição, pode ocorrer oxidação de lipídios e proteínas e, causando danos celulares a alguns constituintes celulares, danos ao DNA, comprometimento da função celular e indução de apoptose (BARBOSA; COSTA; ALFENAS; DE PAULA *et al.*, 2010; BOBERMIN; WARTCHOW; FLORES; LEITE *et al.*, 2015; CRUZ; FREITAS; ALVES; MOREIRA *et al.*, 2000; HALLIWELL, 2006; 2007; WANG; CHEN; JIANG; ZHAO *et al.*, 2018). Dessa forma, estudos realizados no intuito de entender o papel de *M. hominis* no desencadeamento do estresse oxidativo e indução de apoptose são importantes para compreender seu papel em processos patológicos.

Com o intuito de compreender se *M. hominis* poderia causar aumento da expressão das oncoproteínas de HPV, foi realizada a quantificação de E6 e E7 de HPV16 e HPV18 presentes em SiHa e em HeLa por meio de RT-qPCR. O potencial carcinogênico do HPV é relacionado a estas duas proteínas virais, E6 e E7, que são capazes de interagir com proteínas que regulam o ciclo celular e que atuam como supressoras de tumores, como a p53 e pRb. Essa interação provoca a degradação e inativação das proteínas celulares, o que conduziria a transformação, imortalização celular e, posteriormente, a formação de neoplasias (BOYER; WAZER; BAND, 1996; DYSON; HOWLEY; MÜNGER; HARLOW, 1989; SCHEFFNER; WERNESS; HUIBREGTSE; LEVINE *et al.*, 1990; WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). Foi observado um aumento da expressão de E6 e E7 de HPV16 em SiHa após 4 horas de infecção por *M. hominis* e uma diminuição da expressão de E7 após 48 horas. Em HeLa foi observada uma modulação positiva de E6 de HPV 18 após 4 horas de infecção e uma modulação negativa da mesma proteína após 48 horas de infecção. Isso pode justificar o aumento de células em Sub-G0/G1 para essa linhagem, caracterizando apoptose dessas células. Isso porque E6 tem a capacidade de reprimir e degradar p53 (HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993; SCHEFFNER; WERNESS; HUIBREGTSE; LEVINE *et al.*, 1990). Com sua função restabelecida, p53 tem como funções encaminhar a célula para reparo, justificando a parada do ciclo celular em S, e também para morte por apoptose, como foi visto aumento da população celular em Sub-G0/G1 após 48h de infecção (GESKE; NELSON; LIEBERMAN; STRANGE *et al.*, 2000). Este é o primeiro relato de *M. hominis* na regulação das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18. Szostek *et al.* (2014) observaram aumento da

expressão de E6 de HPV 16 em células SiHa após infecção por *Ureaplasma urealyticum* (SZOSTEK; ZAWILIŃSKA; BIERNAT-SUDOLSKA; KOPEĆ *et al.*, 2014). Este efeito é um achado interessante na compreensão da participação de *Mollicutes* na persistência ou não da infecção pelo HPV no desenvolvimento do câncer cervical. Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para o entendimento dessa associação.

Ao analisar os genes relacionados à via de Toll-like, foi verificado que houve uma diferença nas expressões após 1 e 48 horas de infecção por *M. hominis* para as três linhagens celulares. Também foram observadas diferenças quanto à liberação de citocinas. Acredita-se que essas diferenças possam estar ligadas ao processo de adaptação as células analisadas. Em SiHa, após 1 hora de infecção, foi observado aumento na expressão do mRNA de TNF, PTGS2, NFKBIA, LTA, IRF, CXCL8, IL6, IL2, IL1B, CSF3, CSF2, CD86 e CCL2, e uma diminuição da expressão de TLR7, TLR5, INFG, CLEC4E e CD180. Após 48 horas de infecção por *M. hominis* na linhagem SiHa, foi observado um aumento significativo da expressão de TNF, TLR8, PTGS2, CXCL8, IL6, CXCL10 E CSF2 e uma diminuição significativa de TLR9. Entretanto, ao analisar as citocinas, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa da quantidade das citocinas GM-CSF, INF-G, IL-1B, IL-18, IL-6 e TNF- α após 48 de infecção por *M. hominis*. Este resultado pode ser devido ao aumento da expressão de PTGS2, o gene que codifica a COX-2. COX-2 é responsável pela síntese da prostaglandina E₂ (PGE₂) do ácido araquidônico derivado de fosfolípidios da membrana. Goret *et al.* (2017) verificaram que a infecção por *M. hominis* levou à superexpressão da COX-2, o que levou à regulação negativa da NLRP3. Esta molécula está relacionada com a ativação do inflamassoma (GORET; BÉVEN; FAUSTIN; CONTIN-BORDES *et al.*, 2017). De acordo com esta hipótese, uma relação inversa entre a expressão de COX-2 e NLRP3 foi previamente relatada em macrófagos primários humanos (SOKOLOWSKA; CHEN; LIU; MARTINEZ-ANTON *et al.*, 2015). Isso explicaria os níveis diminuídos de algumas citocinas estudadas, como IL-1B e IL-18, e de forma indireta IL-6 e TNF (GROSLAMBERT; PY, 2018; LUKENS; GROSS; KANNEGANTI, 2012), funcionando como um mecanismo de escape do micro-organismo. SiHa expressa a oncoproteína E7 de HPV16, que é responsável por suprimir o efeito inibidor da proliferação causado por TNF- α (BOCCARDO; MANZINI BALDI; CARVALHO; RABACHINI *et al.*, 2010). Mesmo que tenha sido verificada uma diminuição da expressão de E7 por *M. hominis* após 48 de infecção, e um aumento da expressão do gene de TNF no mesmo período, foi observado baixos níveis da citocina no sobrenadante das células. Sendo assim, mais estudos devem ser feitos para entender a interação de *M. hominis* com esta oncoproteína. Outro fato interessante foi o aumento da expressão de TLR8 e diminuição da expressão de TLR9 entre as células infectadas por *M. hominis*. O TLR8, assim como TLR3, TLR7 e TLR9 estão localizados

dentro de vesículas intracelulares, o que poderia levantar a hipótese da participação de *M. hominis* na modulação de TLR endossômicos. Após o reconhecimento de um PAMP/DAMP (*pathogen/damage-associated molecular patterns*), o TLR altera sua conformação e recruta proteínas adaptadoras, como TRIF, TRAM, MyD88 e TIRAP. Os TLRs endossômicos, TLR8, TLR7 e TLR9 utilizam a proteína adaptadora MyD88 para sinalizar através das vias NF- κ B e IRF7. A expressão de TLRs em células imunes inatas vincula o reconhecimento microbiano à indução de mecanismos antimicrobianos, como produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Originalmente associado ao reconhecimento do RNA de fita simples de origem viral, agora há evidências de que o TLR8 humano também é capaz de detectar o RNA de bactérias degradadas dentro de endossomas e lisossomas, induzindo a produção de citocinas dependentes de NF κ B, como TNF- α , IL-6, e dos interferons tipo I (IFNs), como o IFN- β . As funções do TLR8 vão além do reconhecimento de patógenos e incluem ações cruzadas com outros TLR endossômicos, como a interação com o TLR 2 (CERVANTES; DUNHAM-EMS; LA VAKE; PETZKE *et al.*, 2011; CERVANTES; LA VAKE; WEINERMAN; LUU *et al.*, 2013; CERVANTES; WEINERMAN; BASOLE; SALAZAR, 2012; DAVILA; HIBBERD; HARI DASS; WONG *et al.*, 2008; GANTIER; IRVING; KAPARAKIS-LIASKOS; XU *et al.*, 2010). Foi demonstrado que TLR8 regula a expressão tanto de TLR7 quanto de TLR9 (CERVANTES; WEINERMAN; BASOLE; SALAZAR, 2012; WANG; SHAO; BENNETT; SHANKAR *et al.*, 2006). Além desse fato, linhagens celulares provenientes de carcinoma de colo do útero HPV-16 positivos regulam positivamente a expressão de TLR8 e negativamente TLR9. A diminuição da expressão de TLR9 é mecanismo do vírus de evadir o sistema imune e de favorecer a infecção persistente do HPV 16, sendo um evento chave na carcinogênese induzida por vírus. O aumento da expressão de TLR8 pode ser uma tentativa da célula de compensar a diminuição da expressão de TLR9 (HASAN; BATES; TAKESHITA; BILIATO *et al.*, 2007). A diminuição das citocinas visto nas células infectadas por *M. hominis* pode ter exacerbado a capacidade de HPV 16 regular negativamente TLR9, e também ao fato de que as proteínas E6 e E7 de HPV 16 possuem a capacidade de se ligar à várias moléculas adaptadoras de Toll-like, como IRF, causando efeitos a jusante da via (HASAN; BATES; TAKESHITA; BILIATO *et al.*, 2007; REISER; HURST; VOGES; KRAUSS *et al.*, 2011; RONCO; KARPOVA; VIDAL; HOWLEY, 1998; UM; RHYU; KIM; JEON *et al.*, 2002).

Foi observado que HeLa, após 48 de infecção por *M. hominis* apresentou um padrão bem diferente de expressão dos genes envolvidos com as vias de Toll quando comparado com o início da infecção (1h). Após 1 hora, foi observado, por exemplo, um aumento da expressão de TLR4, TLR6, TLR8, HSPD1, IFNA, CD180 e CCL2. Entretanto, após 48h, estes e a grande maioria dos outros genes foram regulados negativamente. Mesmo assim, foi observado um aumento das

citocinas IL-1 β , 1L-18, IL-6 e TNF- α . Essa diminuição na expressão dos genes relacionado à vias de regulação de resposta inflamatória pode ser resultado da tentativa de eliminação do patógeno, morte celular por apoptose e restabelecimento das funções celulares para evitar danos teciduais, até mesmo porque foi visto o aumento da expressão de GADD45 da via de sinalização de danos ao DNA mencionados anteriormente (ITO; TANAKA; OSHINO; OKADO *et al.*, 2016; ZHAN; LORD; ALAMO; HOLLANDER *et al.*, 1994). O aumento da expressão de TLR4 após 1 hora de infecção em HeLa e sua queda após 48h pode caracterizar o início da resposta da célula frente ao patógeno, mas como mecanismo de escape leva a uma diminuição da sua expressão bem como de outros genes a downstream. Como visto por Hopfe *et al.* (2013), em 4h de infecção, *M. hominis* foi observado colonizando e aderindo à parte externa da membrana plasmática, com aumento da expressão de genes relacionados à via de JAK-STAT. Só a partir de 24-48h é possível observar micro-organismos na região intracelular, o que coincidiu com a diminuição na expressão de genes relacionados à inflamação e sinalização celular. Além disso, à medida que a infecção progrediu de 4h para 48h e 2 semanas, ocorreu uma diminuição na quantidade dos micro-organismos, resultado da tentativa de eliminação do patógeno pela célula hospedeira. Os autores também verificaram que moléculas sinalizadoras à montante e à jusante de um componente da via de sinalização altamente regulada muitas vezes não foram reguladas, o que pode ser devido às diferentes meias-vidas dos transcritos ou, alternativamente, a mecanismos reguladores desconhecidos (HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER *et al.*, 2013). No nosso estudo, foi observado a queda da expressão do gene HSPA1A e também das proteínas HSP70 e HSP27, o que corrobora com os achados de Hopfe *et al.* (2013) para HeLa. Além de sua ação como chaperonas moleculares, as proteínas de choque térmico modulam as respostas imunes inatas e adaptativas após a exposição a patógenos microbianos. Portanto, a regulação negativa do HSP70 tem sido interpretada como um mecanismo de evasão imunológica e foi sugerido que isso promove infecção crônica (HOPFE; DEENEN; DEGRANDI; KÖHRER *et al.*, 2013). Observamos que houve diminuição de HMGB1 em células HeLa infectadas com *M. hominis* após 48 horas de infecção, o que justifica a diminuição da formação de colônias no ensaio clonogênico visto no presente estudo. HMGB1 é importante para a viabilidade de linhagens de células tumorais, e sua supressão leva a diminuição do número de colônias. Morale *et al.* (2018), observaram que células tumorais exibiram níveis mais elevados de proteína HMGB1, apesar de terem níveis mais baixos de mRNA, sugerindo que os níveis de proteína HMGB1 podem ser aumentados por mecanismos pós-transcricionais, e que existe uma correlação positiva entre a expressão de TLR4 e HMGB1 (MORALE; DA SILVA ABJAUDE; SILVA; VILLA *et al.*, 2018). Esses achados podem ser justificados pelo fato de a infecção pelo micro-organismo ter levado à diminuição da expressão de

E6 de HPV 18 em HeLa após 48h. A regulação transcricional de TLRs por proteínas do HPV pode é um importante mecanismo utilizado pelo HPV para suprimir a resposta imune do hospedeiro. Em um estudo realizado por YU et al. (2010) foi visto que a expressão de TLR4 é regulada negativamente durante a progressão da neoplasia cervical e que essa regulação negativa pode estar associada à expressão de P16INK4A, que é um marcador crucial da integração do HPV no hospedeiro. Além disso, a produção de citocinas mediada por ativação de TLR4 causada por outros patógenos provavelmente seriam importante para a infecção persistente por HPV, contribuindo assim para a transformação das células epiteliais cervicais (YU; WANG; LI; ZHONG *et al.*, 2010). Tem sido relatado o aumento da expressão de TLR4 a medida que a lesão do colo de útero progride (MORALE; DA SILVA ABJAUDE; SILVA; VILLA *et al.*, 2018; WANG; WENG; SHI; XIA *et al.*, 2014; ZHOU; ZHU; CHENG, 2013). Outros estudos apontam que não é o HPV em si que causa essa alteração na expressão, mas sim outros patógenos da região genital, que poderiam indiretamente contribuir com a persistência do HPV nas lesões pré-cancerosas. Com isso, a infecção por outros patógenos pode cooperar com a ação patogênica do HPV por reação imunomodulatória via TLR4 no desenvolvimento do carcinoma cervical (CHENG; CHEN; WANG; HUANG *et al.*, 2013; WANG; WENG; SHI; XIA *et al.*, 2014; YANG; CHENG; LI, 2017). Como o colo do útero está em constante contato com bactérias, a estimulação bacteriana mediada por TLR4 pode estar envolvida na tumorigênese do câncer cervical. Outro ponto a ser considerado foi que a infecção por *M. hominis* também levou à diminuição da expressão de SARM1 após 48h. A proteína atua como competidora da ligação ao TLR levando à interrupção do sinal e inibindo a resposta imune inata desencadeada pelo TLR em células. Sua expressão é aumentada em células com contendo HPV de alto risco, ao contrário de Myd88, que é regulado negativamente (MORALE; DA SILVA ABJAUDE; SILVA; VILLA *et al.*, 2018). Ressaltamos que HeLa, assim como SiHa, é uma linhagem celular expressando constantemente oncoproteínas do HPV, as quais possuem a capacidade de regular inúmeros processos na célula. Dessa forma, analisar a ação de *Mollicutes* diante de um cenário tão complexo e influenciado pelo HPV se torna um grande desafio, mesmo que seja interessante analisar o efeito do conjunto infeccioso, visto que mimetiza o que ocorre nas infecções no trato urogenital. Entretanto, para melhor compreensão do como *M. hominis* modula a resposta inflamatória em queratinócitos, também avaliamos o modelo de infecção de *M. hominis* em PHK.

Quando avaliamos os resultados das vias de Toll para PHK, os resultados foram diferentes aos encontrados para SiHa e HeLa. Em queratinócitos normais não há o efeito das oncoproteínas do HPV na modulação da resposta celular, principalmente nas vias ativação de TLR, que podem ajudar os queratinócitos na ação contra microrganismos patogênicos (MILLER, 2008). Não houve

uma diminuição global da expressão das vias de Toll como ocorreu com HeLa infectada. Após 1 hora de infecção por *M. hominis* em PHK foi observado um aumento de TNF, TLR4, NFKBIA, CXCL8, IL6, IFNB1, CXCL10, CSF2 E CCL2 e uma diminuição de TLR9 e CD14. Após 48 horas de infecção houve aumento de TNF, CXCL8, IL6, CSF2, CD180, CD14 e CCL2 e uma diminuição da expressão de IL10, IFNB1 e CXCL10. Ao avaliar as citocinas liberadas, foi observado aumento de IL1B, IL18, IL6 e TNF- α . Dessa forma, observamos uma predominância de resposta inflamatória contra a infecção bacteriana, que se acentua e estabelece após 48 horas. No início da infecção (1h), apesar do aumento da expressão de TLR4, houve uma diminuição de CD14 e LY96 (também conhecido como MD-2), estruturas importantes para o reconhecimento de LPS (KIM; KIM, 2017). Todo este aparato é importante para o início da resposta imune inata, isso demonstra que a célula está adaptando sua resposta ao organismo. Patógenos bacterianos podem induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, e IL-12 por estimular TLR4 em células epiteliais da endocervice (ZARIFFARD; NOVAK; LURAIN; SHA *et al.*, 2005). Espécies de micoplasma não contêm ligantes para TLR como LPS, peptídeo glicano e ácido lipoteicoico, mas contêm uma abundância de lipoproteínas aciladas como antígenos da superfície celular, as quais têm sido reportadas como PAMPs. Como foi descrito que TLR4 pode reconhecer outros componentes que não o LPS, estudos podem ser feitos para verificar essa associação para *M. hominis* (SHIMIZU; KIMURA; KIDA; KUWANO *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Abrahams *et al.* (2013) foi visto que *M. hominis* levou ao aumento da expressão de mRNA de TLR4, TLR6 e TLR 8 em células provenientes de membrana fetal humana (ABRAHAMS; POTTER; BHAT; PELTIER *et al.*, 2013). O aumento da expressão de TLR4 em infecções por *Mollicutes* pode estar ligado também à indução de autofagia pelas células (SHIMIZU; KIMURA; KIDA; KUWANO *et al.*, 2014). Além disso, no presente estudo foi observado que a infecção por *M. hominis* levou a uma diminuição de TLR9. Foi demonstrado que a infecção por *M. pulmonis* interfere com o sistema endossômico do hospedeiro, perturba a dinâmica dos endossomos e autofagossomos ao regular positivamente Rab7 e suprime a degradação autofagolisossômica, resultando em um nicho intracelular que pode ser explorado pelo micoplasma ou mesmo por outros patógenos intracelulares (GUERRA; BUCCI, 2016; HU; YU; ZHOU; LI *et al.*, 2014). Rab7 é uma proteína da família das pequenas trifosfatases guanosinas (small GTPases), e sua localização é vista dentro de certas organelas. Rab7 participa da nutrição e apoptose das células reguladas por fatores de crescimento, mediando a internalização e a degradação dos transportadores de nutrientes. Dessa forma, esse gene que pode ser super expresso pela infecção por micoplasma, também foi relacionado à diminuição da expressão de TLR9 (YAO; LIU; LI; CHEN *et al.*, 2009). Esse fato também justificaria a diminuição da produção de IFN- β após 48 horas de infecção. Entretanto,

como houve predominância do aumento da produção de citocinas e quimiocinas envolvidas com o processo inflamatório após 48 horas de infecção, é válido questionar se a infecção por *Mollicutes* pode envolver também outras vias de ativação alternativas, como por CD180 (RP105), mesmo que o papel de CD180 na regulação da resposta inflamatória seja dependente do tipo celular como foi visto para espécies de mycobactérias (SCHULTZ; BLUMENTHAL, 2017). Como não existem relatos da associação de *M. hominis* na modulação de Rab7, TLR9 e de CD180, mais estudos precisam ser feitos para entender a interação *M. hominis*-PHK no processo infeccioso.

7 CONCLUSÕES

Nosso trabalho demonstrou que o dano causado pelas quatro espécies de *Mollicutes* nas linhagens celulares foi dose-dependente e célula-dependente. Além disso, as cepas podem causar alterações na curva de crescimento, mas que esse efeito também depende do tipo celular. Isso é justificável, pois as três linhagens celulares são distintas entre si. No entanto, apesar de ser observado um efeito citopático mais pronunciado para *M. hominis* com base nos experimentos iniciais, a ausência do efeito citopático visível para os outros mollicutes não quer dizer ausência de danos celulares silenciosos e que na grande maioria das vezes cursam com caráter de cronicidade, como ocorre para a grande maioria dos *Mollicutes*.

A infecção por *M. hominis* levou a diminuição na formação de colônias, modulação do ciclo celular, a indução de dano ao DNA e apoptose dependendo do tipo celular. Esse é o primeiro relato da atuação de *M. hominis* na modulação do ciclo celular das presentes linhagens celulares. Isso reforça a necessidade da realização de mais estudos para confirmar a ação deste micro-organismo na regulação do ciclo celular, como a possível presença de ciclomodulinas. Além disso, vale a pena ressaltar que para todas as linhagens, inclusive para SiHa, a qual não apresentou padrão de morte por apoptose, houve aumento de Catalase, o que indica que a infecção pelo micro-organismo pode envolver o aumento do estresse oxidativo para a célula. Esse aumento do estresse oxidativo pode ser devido à amônia produzida pelo metabolismo da arginina necessário pelo micro-organismo. Somado a isso, a depleção de arginina na célula pode ocasionar a inibição da via de mTOR, ativando indiretamente vias de dano ao DNA, o que pode explicar a via pela qual *M. hominis* induziu à parada do ciclo celular e indução de apoptose em HeLa e em PHK.

Outro achado interessante é que *M. hominis* é capaz de alterar a expressão de TLR intracelulares, como TLR 5, TLR 7, TLR8 e TLR 9, indicando a sua influência sobre os sistemas endossômicos. Além disso, a diminuição da expressão dos genes e das proteínas HSP podem evidenciar um mecanismo de evasão imunológica de *M. hominis*.

M. hominis demonstrou participar na alteração das expressões de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18. Essas alterações foram dependentes do tempo de infecção pelo organismo. Além disso, foi visto que houve diminuição global na expressão gênica de vias dependentes e independentes de TLR, mas houve aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e indução de apoptose por HeLa, o que pode ser justificado pela diminuição da expressão da oncoproteína E6 após 48 horas de infecção, retirando seu efeito modulador sobre p53, por exemplo, levando a alterações no ciclo celular e permitindo com que a célula ative as vias de morte celular. Entretanto, este efeito não foi tão pronunciado como em PHK, uma linhagem de célula sem HPV. Esta linhagem também

apresentou aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, com alterações no ciclo celular e morte celular mais intensa do que HeLa. Esse microambiente com intensa atividade pró-inflamatória, em caráter de cronicidade típico dos *Mollicutes*, somado aos mecanismos de escape da morte celular ocasionados pelas oncoproteínas do HPV, podem aumentar os danos celulares. Para SiHa foi observado um padrão diferente ao observado por HeLa e PHK; não foi observado efeitos na apoptose e nem no ciclo celular. Entretanto, foi observado que *M. hominis* levou a alterações na expressão das oncoproteínas de HPV16. Vimos que a infecção ocasionou a diminuição da liberação de citocinas pro-inflamatórias em SiHa, revelando que a infecção pelo micro-organismo poderia contribuir com o vírus na evasão da resposta imune realizada pela célula, sugerindo que a coinfeção entre *M. hominis* e HPV16 poderia contribuir para uma infecção crônica e persistente pelo vírus na célula ou ainda para a colonização de outros patógenos aumentando os danos celulares. Todos esses achados nos levam a crer que a participação de *M. hominis* em processos infecciosos é dependente da dose, do tipo celular e também ao tipo de HPV presente no momento da infecção.

Este é o primeiro estudo analisando o efeito da infecção por *Mollicutes* na modulação de oncoproteínas de HPV em linhagens celulares PHK, HeLa e SiHa, dando uma visão preliminar e panorâmica sobre a ação de *M. hominis* na modulação de diversos processo celulares que poderiam servir como cofatores para a persistência do HPV no desenvolvimento do câncer cervical. Esse estabelecimento é difícil, uma vez que o local da infecção é amplamente colonizado com diversos patógenos diferentes. Entretanto, estudos como este contribuem para a visualização da participação deste micro-organismo em infecções conjuntas ou não com o HPV, abrindo oportunidades para diversas linhas de estudo adjacentes que contribuiriam para validar a modulação realizada por *M. hominis* sobre as oncoproteínas de HPVs de alto risco oncogênico e os possíveis efeitos dessa modulação a médio e longo prazo, abrindo ainda mais o leque para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas. A ausência de relatos na literatura, principalmente para a cepa PG21, reforça a necessidade de mais estudos voltados à interação patógeno-hospedeiro envolvendo este micro-organismo, e que sejam voltados à sua participação da persistência do HPV no desenvolvimento das lesões cervicais.

REFERÊNCIAS¹

ABRAHAMS, V. M.; POTTER, J. A.; BHAT, G.; PELTIER, M. R. *et al.* Bacterial modulation of human fetal membrane Toll-like receptor expression. **Am J Reprod Immunol**, 69, n. 1, p. 33-40, Jan 2013.

ADEBAMOWO, S. N.; MA, B.; ZELLA, D.; FAMOOTU, A. *et al.* Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium in the Vaginal microbiota and Persistent High-Risk Human Papillomavirus Infection. **Front Public Health**, 5, p. 140, 2017.

ALLAM, A. B.; ALVAREZ, S.; BROWN, M. B.; REYES, L. Ureaplasma parvum infection alters filamin A dynamics in host cells. **BMC Infect Dis**, 11, p. 101, 2011.

ALMAGOR, M.; KAHANE, I.; YATZIV, S. Role of superoxide anion in host cell injury induced by mycoplasma pneumoniae infection. A study in normal and trisomy 21 cells. **J Clin Invest**, 73, n. 3, p. 842-847, Mar 1984.

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

AMORIM, A. T.; MARQUES, L. M.; CAMPOS, G. B.; LOBÃO, T. N. *et al.* Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. **BMC Infectious Diseases**, 17, n. 1, 2017 2017.

ANDERSEN, B.; SOKOLOWSKI, I.; ØSTERGAARD, L.; KJØLSETH MØLLER, J. *et al.* Mycoplasma genitalium: prevalence and behavioural risk factors in the general population. **Sex Transm Infect**, 83, n. 3, p. 237-241, Jun 2007.

ARBYN, M.; WEIDERPASS, E.; BRUNI, L.; DE SANJOSÉ, S. *et al.* Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **Lancet Glob Health**, 8, n. 2, p. e191-e203, Feb 2020.

ARYA, O. P.; TONG, C. Y.; HART, C. A.; PRATT, B. C. *et al.* Is Mycoplasma hominis a vaginal pathogen? **Sex Transm Infect**, 77, n. 1, p. 58-62, Feb 2001.

BAKER, T. S.; NEWCOMB, W. W.; OLSON, N. H.; COWSERT, L. M. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophys J**, 60, n. 6, p. 1445-1456, Dec 1991.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23, p. 629-643, 2010

BARBOSA, M. S.; EDMONDS, C.; FISHER, C.; SCHILLER, J. T. *et al.* The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. **EMBO J**, 9, n. 1, p. 153-160, Jan 1990.

BARRÓN, E. V.; ROMAN-BASSAURE, E.; SÁNCHEZ-SANDOVAL, A. L.; ESPINOSA, A. M. *et al.* CDKN3 mRNA as a Biomarker for Survival and Therapeutic Target in Cervical Cancer. **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0137397, 2015.

BARYKOVA, Y. A.; LOGUNOV, D. Y.; SHMAROV, M. M.; VINAROV, A. Z. *et al.* Association of Mycoplasma hominis infection with prostate cancer. **Oncotarget**, 2, n. 4, p. 289-297, Apr 2011.

BASEMAN, J. B.; CAGLE, M.; KORTE, J. E.; HERRERA, C. *et al.* Diagnostic assessment of Mycoplasma genitalium in culture-positive women. **J Clin Microbiol**, 42, n. 1, p. 203-211, Jan 2004.

BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGNA, N. L.; GIRON, J. A. *et al.* Interplay between mycoplasmas and host target cells. **Microb Pathog**, 19, n. 2, p. 105-116, Aug 1995.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol**, 32 Suppl 1, p. S16-24, Mar 2005.

BEN-MENACHEM, G.; MOUSA, A.; BRENNER, T.; PINTO, F. *et al.* Choline deficiency induced by Mycoplasma fermentans enhances apoptosis of rat astrocytes. **FEMS Microbiol Lett**, 201, n. 2, p. 157-162, Jul 2001.

BENDJENNAT, M.; BLANCHARD, A.; LOUTFI, M.; MONTAGNIER, L. *et al.* Role of Mycoplasma penetrans endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. **Infect Immun**, 67, n. 9, p. 4456-4462, Sep 1999.

BERGEY'S. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. v. 4. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. ed. 2.: Springer. 4 2010.

BERNARD, H. U. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. **Infect Genet Evol**, 18, p. 357-361, Aug 2013.

BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, 401, n. 1, p. 70-79, May 2010.

BIENKOWSKA-HABA, M.; SAPP, M. The cytoskeleton in papillomavirus infection. **Viruses**, 3, n. 3, p. 260-271, Mar 2011.

BIERNAT-SUDOLSKA, M.; SZOSTEK, S.; ROJEK-ZAKRZEWSKA, D.; KLIMEK, M. *et al.* Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. **Adv Med Sci**, 56, n. 2, p. 299-303, 2011.

BISSESSOR, M.; TABRIZI, S. N.; BRADSHAW, C. S.; FAIRLEY, C. K. *et al.* The contribution of *Mycoplasma genitalium* to the aetiology of sexually acquired infectious proctitis in men who have sex with men. **Clin Microbiol Infect**, 22, n. 3, p. 260-265, Mar 2016.

BISSESSOR, M.; TABRIZI, S. N.; TWIN, J.; ABDO, H. *et al.* Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium*-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. **Clin Infect Dis**, 60, n. 8, p. 1228-1236, Apr 2015.

BOBERMIN, L. D.; WARTCHOW, K. M.; FLORES, M. P.; LEITE, M. C. *et al.* Ammonia-induced oxidative damage in neurons is prevented by resveratrol and lipoic acid with participation of heme oxygenase 1. **Neurotoxicology**, 49, p. 28-35, Jul 2015.

BOCCARDO, E.; MANZINI BALDI, C. V.; CARVALHO, A. F.; RABACHINI, T. *et al.* Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. **Carcinogenesis**, 31, n. 3, p. 521-531, Mar 2010.

BOCCARDO, E.; NOYA, F.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T. *et al.* HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology**, 328, n. 2, p. 233-243, Oct 2004.

BORNSTEIN, J.; RAHAT, M. A.; ABRAMOVICI, H. Etiology of cervical cancer: current concepts. **Obstet Gynecol Surv**, 50, n. 2, p. 146-154, Feb 1995.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Dis Markers**, 23, n. 4, p. 213-227, 2007.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, 55, n. 4, p. 244-265, Apr 2002.

BOVÉ, J. M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. **Res Microbiol**, 150, n. 4, p. 239-245, May 1999.

BOYER, S. N.; WAZER, D. E.; BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Res**, 56, n. 20, p. 4620-4624, Oct 1996.

BRISTOL, M. L.; DAS, D.; MORGAN, I. M. Why Human Papillomaviruses Activate the DNA Damage Response (DDR) and How Cellular and Viral Replication Persists in the Presence of DDR Signaling. **Viruses**, 9, n. 10, 09 2017.

BRUNI, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M. *et al.* Human Papillomavirus and related diseases in the world - Summary Report. ICO/IARC - Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). 2019.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, 16, n. 1, p. 1-17, Jan 2003.

BUZAŃSKA, L.; ZABŁOCKA, B.; DYBEL, A.; DOMAŃSKA-JANIK, K. *et al.* Delayed induction of apoptosis by ammonia in C6 glioma cells. **Neurochem Int**, 37, n. 2-3, p. 287-297, 2000 Aug-Sep 2000.

CAINI, S.; GANDINI, S.; DUDAS, M.; BREMER, V. *et al.* Sexually transmitted infections and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol**, 38, n. 4, p. 329-338, Aug 2014.

CAMPOS, G. B.; LOBÃO, T. N.; SELIS, N. N.; AMORIM, A. T. *et al.* Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of Brazilian women. **BMC Infect Dis**, 15, p. 60, 2015.

CAMPOS, G. B.; MARQUES, L. M.; REZENDE, I. S.; BARBOSA, M. S. *et al.* *Mycoplasma genitalium* can modulate the local immune response in patients with endometriosis. **Fertil Steril**, 109, n. 3, p. 549-560.e544, 03 2018.

CARTER, J. R.; DING, Z.; ROSE, B. R. HPV infection and cervical disease: a review. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, 51, n. 2, p. 103-108, Apr 2011.

CASELL, G. H.; WAITES, K. B.; WATSON, H. L.; CROUSE, D. T. *et al.* *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. **Clin Microbiol Rev**, 6, n. 1, p. 69-87, Jan 1993.

CASTLE, P. E.; GIULIANO, A. R. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 29-34, 2003.

CAZANAVE, C.; MANHART, L. E.; BÉBÉAR, C. *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen. **Med Mal Infect**, 42, n. 9, p. 381-392, Sep 2012.

CERVANTES, J. L.; DUNHAM-EMS, S. M.; LA VAKE, C. J.; PETZKE, M. M. *et al.* Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN-beta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 9, p. 3683-3688, Mar 2011.

CERVANTES, J. L.; LA VAKE, C. J.; WEINERMAN, B.; LUU, S. *et al.* Human TLR8 is activated upon recognition of *Borrelia burgdorferi* RNA in the phagosome of human monocytes. **J Leukoc Biol**, 94, n. 6, p. 1231-1241, Dec 2013.

CERVANTES, J. L.; WEINERMAN, B.; BASOLE, C.; SALAZAR, J. C. TLR8: the forgotten relative revindicated. **Cell Mol Immunol**, 9, n. 6, p. 434-438, Nov 2012.

CHEN, X. S.; GARCEA, R. L.; GOLDBERG, I.; CASINI, G. *et al.* Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Mol Cell**, 5, n. 3, p. 557-567, Mar 2000.

CHEN, Z.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; XIE, B. Analysis of the Oxidative Stress Status in Nonspecific Vaginitis and Its Role in Vaginal Epithelial Cells Apoptosis. **Biomed Res Int**, 2015, p. 795656, 2015.

CHENG, Y.; CHEN, G.; WANG, X.; HUANG, Y. *et al.* TLR4 May Accelerate Hypoxia Reaction to Promote the Occurrence and Progress of Cervical Lesions by Infected Pathogenic Microorganisms Other than HPV. **Journal of Cancer Therapy**, Vol.04No.02, p. 5, 2013.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; AGUADO, T.; FRANCESCHI, S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer**, 89, n. 1, p. 101-105, Jul 2003.

COHEN, C. R.; MANHART, L. E.; BUKUSI, E. A.; ASTETE, S. *et al.* Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. **Lancet**, 359, n. 9308, p. 765-766, Mar 2002.

COHEN, C. R.; MUGO, N. R.; ASTETE, S. G.; ODONDO, R. *et al.* Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. **Sex Transm Infect**, 81, n. 6, p. 463-466, Dec 2005.

COX, C.; WATT, A. P.; MCKENNA, J. P.; COYLE, P. V. *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 35, n. 3, p. 481-487, Mar 2016.

CROOK, T.; TIDY, J. A.; VOUSDEN, K. H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell**, 67, n. 3, p. 547-556, Nov 1991.

CRUZ, H. J.; FREITAS, C. M.; ALVES, P. M.; MOREIRA, J. L. *et al.* Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme Microb Technol**, 27, n. 1-2, p. 43-52, Jul 2000.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, 445, n. 1-2, p. 21-34, Oct 2013.

CUNHA, R. A.; KOIFFMAN, C. P.; SOUZA, D. H.; TAKEI, K. Clastogenic effects of different *Ureaplasma urealyticum* serovars on human chromosomes. **Braz J Med Biol Res**, 30, n. 6, p. 749-757, Jun 1997.

DANDO, S. J.; SWEENEY, E. L.; KNOX, C. L. *Ureaplasma*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 2015. p. 1-28.

DAVILA, S.; HIBBERD, M. L.; HARI DASS, R.; WONG, H. E. *et al.* Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. **PLoS Genet**, 4, n. 10, p. e1000218, Oct 2008.

DE CASTRO-SOBRINHO, J. M.; RABELO-SANTOS, S. H.; FUGUEIREDO-ALVES, R. R.; DERCHAIN, S. *et al.* Bacterial vaginosis and inflammatory response showed association with severity of cervical neoplasia in HPV-positive women. **Diagn Cytopathol**, 44, n. 2, p. 80-86, Feb 2016.

DE SILVA, N. S.; QUINN, P. A. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. **J Clin Microbiol**, 29, n. 7, p. 1498-1503, Jul 1991.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U. *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, 324, n. 1, p. 17-27, Jun 2004.

DEGUCHI, T.; YOSHIDA, T.; MIYAZAWA, T.; YASUDA, M. *et al.* Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. **Sex Transm Dis**, 31, n. 3, p. 192-195, Mar 2004.

DESSI, D.; DELOGU, G.; EMONTE, E.; CATANIA, M. R. *et al.* Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoan in transmitting bacterial infection. **Infect Immun**, 73, n. 2, p. 1180-1186, Feb 2005.

DIENES, L.; EDSALL, G. Observations on the L-Organism of Klieneberger. **Exp Biol Med (Maywood)**, 36, n. 5, p. 740-744, 1937-06-01 1937.

DIENES, L.; EDSALL, G. L Organisms of Klieneberger and *Streptobacillus moniliformis*. **The Journal of Infectious Diseases** 65, n. 1, p. 24-42, 1939.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**, 110, n. 5, p. 525-541, May 2006.

DOORBAR, J.; CUBIE, H. Molecular basis for advances in cervical screening. **Mol Diagn**, 9, n. 3, p. 129-142, 2005.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G. *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, 30 Suppl 5, p. F55-70, Nov 2012.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MÜNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, 243, n. 4893, p. 934-937, Feb 1989.

EKIEL, A. M.; FRIEDEK, D. A.; ROMANIK, M. K.; JÓŹWIAK, J. *et al.* Occurrence of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in women with cervical dysplasia in Katowice, Poland. **J Korean Med Sci**, 24, n. 6, p. 1177-1181, Dec 2009.

EL-AOUAR FILHO, R. A.; NICOLAS, A.; DE PAULA CASTRO, T. L.; DEPLANCHE, M. *et al.* Corrigendum: Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. **Front Cell Infect Microbiol**, 7, p. 364, 2017 2017a.

EL-AOUAR FILHO, R. A.; NICOLAS, A.; DE PAULA CASTRO, T. L.; DEPLANCHE, M. *et al.* Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. **Front Cell Infect Microbiol**, 7, p. 208, 2017b.

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**, 81, n. 1, p. 73-78, Feb 2005.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, 22, n. 33, p. 5201-5207, Aug 2003.

FENG, S. H.; TSAI, S.; RODRIGUEZ, J.; LO, S. C. Mycoplasmal infections prevent apoptosis and induce malignant transformation of interleukin-3-dependent 32D hematopoietic cells. **Mol Cell Biol**, 19, n. 12, p. 7995-8002, Dec 1999.

FERIYAWATI, L.; ANGGRAINI, D. R.; NASUTION, T. A. Co-Infection of Human Papillomavirus with Mycoplasma Hominis/Ureaplasma Urealyticum Among Female Sex Workers in Medan, Indonesia. **Open Access Maced J Med Sci**, 7, n. 20, p. 3425-3428, Oct 2019.

FORNACE, A. J.; NEBERT, D. W.; HOLLANDER, M. C.; LUETHY, J. D. *et al.* Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. **Mol Cell Biol**, 9, n. 10, p. 4196-4203, Oct 1989.

FOSCHI, C.; SALVO, M.; D'ANTUONO, A.; GASPARI, V. *et al.* Distribution of genital Mollicutes in the vaginal ecosystem of women with different clinical conditions. **New Microbiol**, 41, n. 3, p. 225-229, 07 2018.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D. *et al.* The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium. **Science**, 270, n. 5235, p. 397-403, Oct 1995.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol**, 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2004.

GANTIER, M. P.; IRVING, A. T.; KAPARAKIS-LIASKOS, M.; XU, D. *et al.* Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. **Hum Mutat**, 31, n. 9, p. 1069-1079, Sep 2010.

GDOURA, R.; KCHAOU, W.; CHAARI, C.; ZNAZEN, A. *et al.* Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. **BMC Infect Dis**, 7, p. 129, 2007.

GESKE, F. J.; NELSON, A. C.; LIEBERMAN, R.; STRANGE, R. *et al.* DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis. **Cell Death Differ**, 7, n. 4, p. 393-401, Apr 2000.

GILLET, E.; MEYS, J. F.; VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R. *et al.* Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 7, n. 10, p. e45201, 2012.

GLASS, J. I.; LEFKOWITZ, E. J.; GLASS, J. S.; HEINER, C. R. *et al.* The complete sequence of the mucosal pathogen Ureaplasma urealyticum. **Nature**, 407, n. 6805, p. 757-762, Oct 2000.

GORET, J.; BÉVEN, L.; FAUSTIN, B.; CONTIN-BORDES, C. *et al.* Interaction of Mycoplasma hominis PG21 with Human Dendritic Cells: Interleukin-23-Inducing Mycoplasmal Lipoproteins and Inflammasome Activation of the Cell. **J Bacteriol**, 199, n. 15, 08 2017.

GROSLAMBERT, M.; PY, B. F. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. **J Inflamm Res**, 11, p. 359-374, 2018.

GUERRA, F.; BUCCI, C. Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. **Cells**, 5, n. 3, Aug 2016.

GUIJON, F.; PARASKEVAS, M.; RAND, F.; HEYWOOD, E. *et al.* Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Gynaecol Obstet**, 37, n. 3, p. 185-191, Mar 1992.

GUPTA, A.; GUPTA, S.; MITTAL, A.; CHANDRA, P. *et al.* Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. **Arch Gynecol Obstet**, 280, n. 6, p. 981-985, Dec 2009.

HAGGERTY, C. L.; TAYLOR, B. D. Mycoplasma genitalium: an emerging cause of pelvic inflammatory disease. **Infect Dis Obstet Gynecol**, 2011, p. 959816, 2011.

HALBERT, C. L.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J Virol**, 65, n. 1, p. 473-478, Jan 1991.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochem Sci**, 31, n. 9, p. 509-515, Sep 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, 35, n. Pt 5, p. 1147-1150, Nov 2007.

HARADA, K.; TANAKA, H.; KOMORI, S.; TSUJI, Y. *et al.* Vaginal infection with Ureaplasma urealyticum accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. **Microbiol Immunol**, 52, n. 6, p. 297-304, Jun 2008.

HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A. *et al.* TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **J Immunol**, 178, n. 5, p. 3186-3197, Mar 2007.

HAY, R. J.; MACY, M. L.; CHEN, T. R. Mycoplasma infection of cultured cells. **Nature**, 339, n. 6224, p. 487-488, Jun 1989.

HAYES, M. M.; LI, B. J.; WEAR, D. J.; LO, S. C. Pathogenicity of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma penetrans* in experimentally infected chicken embryos. **Infect Immun**, 64, n. 8, p. 3419-3424, Aug 1996.

HE, J.; WANG, S.; ZENG, Y.; YOU, X. *et al.* Binding of CD14 to *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins upregulates TNF- α . **Inflammation**, 37, n. 2, p. 322-330, Apr 2014.

HE, J.; YOU, X.; ZENG, Y.; YU, M. *et al.* *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins activate NF-kappaB through toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. **Clin Vaccine Immunol**, 16, n. 12, p. 1750-1757, Dec 2009.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**, 16, n. 2, p. 83-97, 2006 Mar-Apr 2006.

HENRICH, B.; HOPFE, M.; KITZEROW, A.; HADDING, U. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an opp operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. **J Bacteriol**, 181, n. 16, p. 4873-4878, Aug 1999.

HENRICH, B.; KRETZMER, F.; DEENEN, R.; KÖHRER, K. Validation of a novel Mho microarray for a comprehensive characterisation of the *Mycoplasma hominis* action in HeLa cell infection. **PLoS One**, 12, n. 7, p. e0181383, 2017.

HERFS, M.; YAMAMOTO, Y.; LAURY, A.; WANG, X. *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 26, p. 10516-10521, Jun 2012.

HO, G. Y.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C. J. *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med**, 338, n. 7, p. 423-428, Feb 1998.

HOPFE, M.; DAHLMANN, T.; HENRICH, B. In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. **BMC Microbiol**, 11, p. 185, Aug 2011.

HOPFE, M.; DEENEN, R.; DEGRANDI, D.; KÖHRER, K. *et al.* Host cell responses to persistent mycoplasmas—different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis*. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e54219, 2013.

HOPFE, M.; HENRICH, B. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. **BMC Microbiol**, 8, p. 55, Apr 2008.

HORNER, P.; DONDERS, G.; CUSINI, M.; GOMBERG, M. *et al.* Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? - a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 32, n. 11, p. 1845-1851, Nov 2018.

HU, X.; YU, J.; ZHOU, X.; LI, Z. *et al.* Synergism between upregulation of Rab7 and inhibition of autophagic degradation caused by mycoplasma facilitates intracellular mycoplasma infection. **Mol Med Rep**, 9, n. 3, p. 793-800, Mar 2014.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. **Mol Cell Biol**, 13, n. 8, p. 4918-4927, Aug 1993.

IARC. Human Papillomaviruses - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 90 2007.

IARC-MONOGRAPHS. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - A review of human carcinogens. Part B: Biological agents.** Lyon, France: 2012. 978 92 832 1319 2.

INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro : INCA 2019.

ITO, S.; TANAKA, Y.; OSHINO, R.; OKADO, S. *et al.* GADD34 suppresses lipopolysaccharide-induced sepsis and tissue injury through the regulation of macrophage activation. **Cell Death Dis**, 7, p. e2219, 05 2016.

JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 18, n. 1, p. 1-11, Jan 2004.

JENSEN, J. S.; ULDM, S. A.; SØNDERGÅRD-ANDERSEN, J.; VUUST, J. *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. **J Clin Microbiol**, 29, n. 1, p. 46-50, Jan 1991.

JIANG, W.; YAN, Y.; JI, W.; WANG, Y. *et al.* Clinical significance of different bacterial load of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. **Braz J Infect Dis**, 18, n. 2, p. 124-128, 2014 Mar-Apr 2014.

JOST, C. A.; MARIN, M. C.; KAELIN, W. G. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. **Nature**, 389, n. 6647, p. 191-194, Sep 1997.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr Cancer Drug Targets**, 7, n. 1, p. 79-89, Feb 2007.

KEANE, F. E.; THOMAS, B. J.; GILROY, C. B.; RENTON, A. *et al.* The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. **Int J STD AIDS**, 11, n. 6, p. 356-360, Jun 2000.

KESSIS, T. D.; SLEBOS, R. J.; NELSON, W. G.; KASTAN, M. B. *et al.* Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90, n. 9, p. 3988-3992, May 1993.

KHAN, S.; ZAKARIAH, M.; ROLFO, C.; ROBRECHT, L. *et al.* Prediction of *mycoplasma hominis* proteins targeting in mitochondria and cytoplasm of host cells and their implication in prostate cancer etiology. **Oncotarget**, 8, n. 19, p. 30830-30843, May 2017.

KIM, S. J.; KIM, H. M. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. **BMB Rep**, 50, n. 2, p. 55-57, Feb 2017.

KING, C. C.; JAMIESON, D. J.; WIENER, J.; CU-UVIN, S. *et al.* Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. **Infect Dis Obstet Gynecol**, 2011, p. 319460, 2011.

KLEIN, C.; GONZALEZ, D.; SAMWEL, K.; KAHESA, C. *et al.* Relationship between the Cervical Microbiome, HIV Status, and Precancerous Lesions. **mBio**, 10, n. 1, 02 2019.

KLEIN, C.; SAMWEL, K.; KAHESA, C.; MWAISELAGE, J. *et al.* *Mycoplasma* Co-Infection Is Associated with Cervical Cancer Risk. **Cancers (Basel)**, 12, n. 5, Apr 2020.

KLIENEBERGER, E. Pleuropneumonia-like organisms of diverse provenance: some results of an enquiry into methods of differentiation. **J Hyg (Lond)**, 38, n. 4, p. 458-476, Jul 1938.

KLIENEBERGER, E.; STEABBEN, D. B. On a pleuropneumonia-like organism in lung lesions of rats, with notes on the clinical and pathological features of the underlying condition. **J Hyg (Lond)**, 37, n. 1, p. 143-152.143, Jan 1937.

KONDRATYEVA, Y. S.; NEYMARK, A. I.; AIDAGULOVA, S. V.; TARANINA, T. S. *et al.* Causative Role of *Ureaplasma Urealyticum* and other Sexually Transmitted Infections in the Urethral Meatus Polyp Development in Women. **International Journal of BioMedicine**, 3, n. 3, p. 170-173, 2013.

KONG, F.; JAMES, G.; MA, Z.; GORDON, S. *et al.* Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*--support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. **Int J Syst Bacteriol**, 49 Pt 4, p. 1879-1889, Oct 1999.

KONG, F.; MA, Z.; JAMES, G.; GORDON, S. *et al.* Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. **J Clin Microbiol**, 38, n. 3, p. 1175-1179, Mar 2000.

KORTE, J. E.; BASEMAN, J. B.; CAGLE, M. P.; HERRERA, C. *et al.* Cervicitis and genitourinary symptoms in women culture positive for *Mycoplasma genitalium*. **Am J Reprod Immunol**, 55, n. 4, p. 265-275, Apr 2006.

KORZYŃSKA, A.; ZYCHOWICZ, M. A method of estimation of the cell doubling time on basis of the cell culture monitoring data. **Biocybernetics and Biomedical Engineering**, Vol. 28, no. 4, p. 75-82, 2008.

KRAUSE, D. C.; LEITH, D. K.; WILSON, R. M.; BASEMAN, J. B. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. **Infect Immun**, 35, n. 3, p. 809-817, Mar 1982.

KUNDSIN, R. B.; AMPOLA, M.; STREETER, S.; NEURATH, P. Chromosomal aberrations induced by T strains mycoplasmas. **J Med Genet**, 8, n. 2, p. 181-187, Jun 1971.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat Rev Immunol**, 4, n. 3, p. 211-222, Mar 2004.

KYO, S.; INOUE, M.; HAYASAKA, N.; INOUE, T. *et al.* Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. **Virology**, 200, n. 1, p. 130-139, Apr 1994.

LEITÃO, E.; COSTA, A. C.; BRITO, C.; COSTA, L. *et al.* *Listeria monocytogenes* induces host DNA damage and delays the host cell cycle to promote infection. **Cell Cycle**, 13, n. 6, p. 928-940, 2014.

LI, Y. H.; CHEN, M.; BRAUNER, A.; ZHENG, C. *et al.* *Ureaplasma urealyticum* induces apoptosis in human lung epithelial cells and macrophages. **Biol Neonate**, 82, n. 3, p. 166-173, 2002.

LIN, D.; KOUZY, R.; ABI JAOUDE, J.; NOTICEWALA, S. S. *et al.* Microbiome factors in HPV-driven carcinogenesis and cancers. **PLoS Pathog**, 16, n. 6, p. e1008524, Jun 2020.

LIS, R.; ROWHANI-RAHBAR, A.; MANHART, L. E. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**, 61, n. 3, p. 418-426, Aug 2015.

LIU, L.; CAO, G.; ZHAO, Z.; ZHAO, F. *et al.* High bacterial loads of *Ureaplasma* may be associated with non-specific cervicitis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 46, p. 637-641, 2014-08-15 2014. research-article.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F. *et al.* Adhesion onto and invasion into mammalian cells by mycoplasma penetrans: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. **Mod Pathol**, 6, n. 3, p. 276-280, May 1993.

LOBÃO, T. N. **Detecção de Ureaplasma urealyticum e U. parvum no trato urogenital e a sua relação com polimorfismos genéticos e expressão de citocinas em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista - BA.** 2013. 139 f. (Mestrado) - Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOGUNOV, D. Y.; SCHEBLYAKOV, D. V.; ZUBKOVA, O. V.; SHMAROV, M. M. *et al.* Mycoplasma infection suppresses p53, activates NF-kappaB and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation. **Oncogene**, 27, n. 33, p. 4521-4531, Jul 2008.

LUKENS, J. R.; GROSS, J. M.; KANNEGANTI, T. D. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. **Front Immunol**, 3, p. 315, 2012.

LUKIC, A.; CANZIO, C.; PATELLA, A.; GIOVAGNOLI, M. *et al.* Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: the role of Ureaplasma urealyticum. **Anticancer Res**, 26, n. 6C, p. 4843-4849, 2006 Nov-Dec 2006.

MARQUES, L. M.; UENO, P. M.; BUZINHANI, M.; CORTEZ, B. A. *et al.* Invasion of Ureaplasma diversum in Hep-2 cells. **BMC Microbiol**, 10, p. 83, 2010.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5, n. 9, Sep 2013.

MASOVER, G. K.; RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Effects of carbon dioxide, urea, and ammonia on growth of Ureaplasma urealyticum (T-strain mycoplasma). **J Bacteriol**, 130, n. 1, p. 292-296, Apr 1977.

MCBRIDE, A. A. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. **Adv Virus Res**, 72, p. 155-205, 2008.

MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. **Virology**, 445, n. 1-2, p. 57-79, Oct 2013.

MCBRIDE, A. A. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. **Biol Chem**, 398, n. 8, p. 919-927, 07 2017.

MCGOWIN, C. L.; ANDERSON-SMITS, C. Mycoplasma genitalium: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. **PLoS Pathog**, 7, n. 5, p. e1001324, May 2011.

MCGOWIN, C. L.; ANNAN, R. S.; QUAYLE, A. J.; GREENE, S. J. *et al.* Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. **Infect Immun**, 80, n. 11, p. 3842-3849, Nov 2012.

MCGOWIN, C. L.; POPOV, V. L.; PYLES, R. B. Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. **BMC Microbiol**, 9, p. 139, 2009.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001.

MILES, R. J.; TAYLOR, R. R.; VARSANI, H. Oxygen uptake and H₂O₂ production by fermentative *Mycoplasma* spp. **J Med Microbiol**, 34, n. 4, p. 219-223, Apr 1991.

MILLER, L. S. Toll-like receptors in skin. **Adv Dermatol**, 24, p. 71-87, 2008.

MITRA, A.; MACINTYRE, D. A.; MARCHESI, J. R.; LEE, Y. S. *et al.* The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? **Microbiome**, 4, n. 1, p. 58, 11 2016.

MOHADJER, S.; KAFTARIANS, S. The interaction between *Mycoplasma hominis* and poliovirus in cell culture. **J Gen Virol**, 20, n. 3, p. 303-310, Sep 1973.

MOI, H.; REINTON, N.; MOGHADDAM, A. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation. **Sex Transm Infect**, 85, n. 1, p. 10-14, Feb 2009.

MONGELOS, P.; MENDOZA, L. P.; RODRIGUEZ-RIVEROS, I.; CASTRO, A. *et al.* Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. **Int J Infect Dis**, 39, p. 44-49, Oct 2015.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, 10, n. 8, p. 550-560, Aug 2010.

MORALE, M. G.; DA SILVA ABJAUDE, W.; SILVA, A. M.; VILLA, L. L. *et al.* HPV-transformed cells exhibit altered HMGB1-TLR4/MyD88-SARM1 signaling axis. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 3476, 02 2018.

MUNOZ, J. L.; GOJE, O. J. *Mycoplasma genitalium*: An Emerging Sexually Transmitted Infection. **Scientifica (Cairo)**, 2016, p. 7537318, 2016.

MURRAY, G. L.; DANIELEWSKI, J.; BODIYABADU, K.; MACHALEK, D. A. *et al.* Analysis of Infection Loads in *Mycoplasma genitalium* Clinical Specimens by Use of a Commercial Diagnostic Test. **J Clin Microbiol**, 57, n. 9, Sep 2019.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, 348, n. 6, p. 518-527, Feb 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 2006.

MÜNGER, K.; PHELPS, W. C.; BUBB, V.; HOWLEY, P. M. *et al.* The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **J Virol**, 63, n. 10, p. 4417-4421, Oct 1989.

NASCIMENTO, C. M. D. O.; FIGUEIREDO, C. A.; TIMENETSKY, J. Sensitivity of rabbit fibrochondrocytes to mycoplasmas. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33, p. 243-246, 2002.

NOUGAYRÈDE, J. P.; TAIEB, F.; DE RYCKE, J.; OSWALD, E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. **Trends Microbiol**, 13, n. 3, p. 103-110, Mar 2005.

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

OSWALD, E.; NOUGAYRÈDE, J. P.; TAIEB, F.; SUGAI, M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. **Curr Opin Microbiol**, 8, n. 1, p. 83-91, Feb 2005.

PADMINI, E.; UTHRA, V. Role of *Ureaplasma urealyticum* in altering the endothelial metal concentration during preeclampsia. **Placenta**, 33, n. 4, p. 304-311, Apr 2012.

PARALANOV, V.; LU, J.; DUFFY, L. B.; CRABB, D. M. *et al.* Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. **BMC Microbiol**, 12, n. 1, p. 88, May 2012.

PEKMEZOVIC, M.; MOGAVERO, S.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. Host-Pathogen Interactions during Female Genital Tract Infections. **Trends Microbiol**, 27, n. 12, p. 982-996, Dec 2019.

PEREYRE, S.; SIRAND-PUGNET, P.; BEVEN, L.; CHARRON, A. *et al.* Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. **PLoS Genet**, 5, n. 10, p. e1000677, Oct 2009.

POLLACK, J. D.; WILLIAMS, M. V.; MCELHANEY, R. N. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. **Crit Rev Microbiol**, 23, n. 4, p. 269-354, 1997.

PURCELL, R. H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; WONG, D.; CHANOCK, R. M. Color test for the measurement of antibody to T-strain mycoplasmas. **J Bacteriol**, 92, n. 1, p. 6-12, Jul 1966.

QUAN, L.; DONG, R.; YANG, W.; CHEN, L. *et al.* Simultaneous detection and comprehensive analysis of HPV and microbiome status of a cervical liquid-based cytology sample using Nanopore MinION sequencing. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 19337, 12 2019.

QUINET, A.; VESSONI, A. T.; ROCHA, C. R.; GOTTIFREDI, V. *et al.* Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. **DNA Repair (Amst)**, 14, p. 27-38, Feb 2014.

RAJALINGAM, K.; SHARMA, M.; LOHMANN, C.; OSWALD, M. *et al.* Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in Chlamydia trachomatis-infected cells. **PLoS One**, 3, n. 9, p. e3102, 2008.

RAMÍREZ-SALAZAR, E.; CENTENO, F.; NIETO, K.; VALENCIA-HERNÁNDEZ, A. *et al.* HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. **Virology**, 8, p. 247, 2011.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G. M. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108 Suppl 1, p. 4680-4687, Mar 2011.

RAZIN, S. **Methods in Mycoplasma V1: Mycoplasma Characterization**. Elsevier Science, 2012. 9780323147132.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. **Biologicals**, 38, n. 2, p. 183-190, Mar 2010.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma: Molecular characterization**. Academic Press, 1995. 9780125838054.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev**, 62, n. 4, p. 1094-1156, Dec 1998.

REISER, J.; HURST, J.; VOGES, M.; KRAUSS, P. *et al.* High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression. **J Virol**, 85, n. 21, p. 11372-11380, Nov 2011.

REYES, L.; REINHARD, M.; O'DONELL, L. J.; STEVENS, J. *et al.* Rat strains differ in susceptibility to *Ureaplasma parvum*-induced urinary tract infection and struvite stone formation. **Infect Immun**, 74, n. 12, p. 6656-6664, Dec 2006.

ROBERTSON, J. A.; CHEN, M. H. Effects of manganese on the growth and morphology of *Ureaplasma urealyticum*. **J Clin Microbiol**, 19, n. 6, p. 857-864, Jun 1984.

ROBERTSON, J. A.; PYLE, L. E.; STEMKE, G. W.; FINCH, L. R. Human ureaplasmas show diverse genome sizes by pulsed-field electrophoresis. **Nucleic Acids Res**, 18, n. 6, p. 1451-1455, Mar 1990.

ROBERTSON, J. A.; STEMKE, G. W. Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. **J Clin Microbiol**, 15, n. 5, p. 873-878, May 1982.

ROBERTSON, J. A.; STEMKE, G. W.; DAVIS, J. W.; HARASAWA, R. *et al.* Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard *et al.* 1974) Robertson *et al.* 2001. **Int J Syst Evol Microbiol**, 52, n. Pt 2, p. 587-597, Mar 2002.

RODRIGUES, M. M.; FERNANDES, P.; HADDAD, J. P.; PAIVA, M. C. *et al.* Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. **J Obstet Gynaecol**, 31, n. 3, p. 237-241, 2011.

ROGERS, M. B. *Mycoplasma* and cancer: in search of the link. **Oncotarget**, 2, n. 4, p. 271-273, Apr 2011.

ROMERO, R.; HASSAN, S. S.; GAJER, P.; TARCA, A. L. *et al.* The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, 2, n. 1, p. 4, 2014.

RONCO, L. V.; KARPOVA, A. Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev**, 12, n. 13, p. 2061-2072, Jul 1998.

ROSENSHINE, I.; FINLAY, B. B. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. **Bioessays**, 15, n. 1, p. 17-24, Jan 1993.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol Rev**, 83, n. 2, p. 417-432, Apr 2003.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends Microbiol**, 6, n. 11, p. 436-440, Nov 1998.

SANCHEZ-GARCIA, E. K.; CONTRERAS-PAREDES, A.; MARTINEZ-ABUNDIS, E.; GARCIA-CHAN, D. *et al.* Molecular epidemiology of bacterial vaginosis and its association with genital microorganisms in asymptomatic women. **J Med Microbiol**, 68, n. 9, p. 1373-1382, Sep 2019.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J. *et al.* The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, 63, n. 6, p. 1129-1136, Dec 1990.

SCHIFFMAN, M.; CLIFFORD, G.; BUONAGURO, F. M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. **Infect Agent Cancer**, 4, p. 8, 2009.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER, S.; KINNEY, W. *et al.* Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, 103, n. 5, p. 368-383, Mar 2011.

SCHLECHT, N. F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S. *et al.* Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, 286, n. 24, p. 3106-3114, Dec 2001.

SCHMIDT, A.; VON WOEDTKE, T.; BEKESCHUS, S. Periodic Exposure of Keratinocytes to Cold Physical Plasma: An In Vitro Model for Redox-Related Diseases of the Skin. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, p. 9816072, 2016.

SCHULTZ, T. E.; BLUMENTHAL, A. The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. **J Leukoc Biol**, 101, n. 1, p. 183-192, 01 2017.

SETHI, S.; SINGH, G.; SAMANTA, P.; SHARMA, M. Mycoplasma genitalium: an emerging sexually transmitted pathogen. **Indian J Med Res**, 136, n. 6, p. 942-955, Dec 2012.

SFANOS, K. S.; ISAACS, J. T. The "infectious" nature of human prostate cancer: a cautionary note. **Oncotarget**, 2, n. 4, p. 281-283, Apr 2011.

SHAFTI-KERAMAT, S.; HANDISURYA, A.; KRIEHLBER, E.; MENEGUZZI, G. *et al.* Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. **J Virol**, 77, n. 24, p. 13125-13135, Dec 2003.

SHANG, X. J.; HUANG, Y. F.; XIONG, C. L.; XU, J. P. *et al.* Ureaplasma urealyticum infection and apoptosis of spermatogenic cells. **Asian J Androl**, 1, n. 3, p. 127-129, Sep 1999.

SHEN-GUNTHER, J.; CAI, H.; ZHANG, H.; WANG, Y. Abundance of HPV L1 Intra-Genotype Variants With Capsid Epitopic Modifications Found Within Low- and High-Grade Pap Smears With Potential Implications for Vaccinology. **Front Genet**, 10, p. 489, 2019.

SHEPARD, M. C. The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. **Am J Syph Gonorrhea Vener Dis**, 38, n. 2, p. 113-124, Mar 1954.

SHEPARD, M. C.; LUNCEFORD, C. D.; FORD, D. K.; PURCELL, R. H. *et al.* *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov.: Proposed Nomenclature for the Human T (T-Strain) Mycoplasmas. 24, n. 2, p. 160-171, 1974-04-01 1974.

SHIMADA, Y.; ITO, S.; MIZUTANI, K.; SUGAWARA, T. *et al.* Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. **Int J STD AIDS**, 25, n. 4, p. 294-298, Mar 2014.

SHIMIZU, T.; KIMURA, Y.; KIDA, Y.; KUWANO, K. *et al.* Cytadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4. **Infect Immun**, 82, n. 7, p. 3076-3086, Jul 2014.

SHIPITSYNA, E.; ROOS, A.; DATCU, R.; HALLÉN, A. *et al.* Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? **PLoS One**, 8, n. 4, p. e60670, 2013.

SIADAT-PAJOUH, M.; PERIASAMY, A.; AYSCUE, A. H.; MOSCICKI, A. B. *et al.* Detection of human papillomavirus type 16/18 DNA in cervicovaginal cells by fluorescence based in situ hybridization and automated image cytometry. **Cytometry**, 15, n. 3, p. 245-257, Mar 1994.

SIMMONS, W. L.; DYBVIG, K. Catalase Enhances Growth and Biofilm Production of *Mycoplasma pneumoniae*. **Curr Microbiol**, 71, n. 2, p. 190-194, Aug 2015.

SMITH, D. G.; RUSSELL, W. C.; INGLEDEW, W. J.; THIRKELL, D. Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealyticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. **J Bacteriol**, 175, n. 11, p. 3253-3258, Jun 1993.

SMITH, J. S.; MUÑOZ, N.; HERRERO, R.; ELUF-NETO, J. *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. **J Infect Dis**, 185, n. 3, p. 324-331, Feb 2002.

SMITH, M. L.; CHEN, I. T.; ZHAN, Q.; BAE, I. *et al.* Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. **Science**, 266, n. 5189, p. 1376-1380, Nov 1994.

SOKOLOWSKA, M.; CHEN, L. Y.; LIU, Y.; MARTINEZ-ANTON, A. *et al.* Prostaglandin E2 Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation through EP4 Receptor and Intracellular Cyclic AMP in Human Macrophages. **J Immunol**, 194, n. 11, p. 5472-5487, Jun 2015.

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

SUDENGA, S. L.; SHRESTHA, S. Key considerations and current perspectives of epidemiological studies on human papillomavirus persistence, the intermediate phenotype to cervical cancer. **Int J Infect Dis**, 17, n. 4, p. e216-220, Apr 2013.

SUN, G.; XU, X.; WANG, Y.; SHEN, X. *et al.* Mycoplasma pneumoniae infection induces reactive oxygen species and DNA damage in A549 human lung carcinoma cells. **Infect Immun**, 76, n. 10, p. 4405-4413, Oct 2008.

SZOSTEK, S.; ZAWILIŃSKA, B.; BIERNAT-SUDOLSKA, M.; KOPEĆ, J. *et al.* Differences in the expression of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 oncogene mRNA in SiHa cell line inoculated with CMV, HSV or ureaplasmas. **Folia Biol (Krakow)**, 62, n. 1, p. 73-78, 2014.

TAIEB, F.; NOUGAYRÈDE, J. P.; WATRIN, C.; SAMBA-LOUAKA, A. *et al.* Escherichia coli cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. **Cell Microbiol**, 8, n. 12, p. 1910-1921, Dec 2006.

TANAKA, R.; ANDACHI, Y.; MUTO, A. Evolution of tRNAs and tRNA genes in Acholeplasma laidlawii. **Nucleic Acids Res**, 19, n. 24, p. 6787-6792, Dec 1991.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mollicutes in vaginal microbiology: Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum and Mycoplasma genitalium. **Res Microbiol**, 168, n. 9-10, p. 875-881, 2017 Nov - Dec 2017.

TAYLOR-ROBINSON, D.; GILROY, C. B.; THOMAS, B. J.; HAY, P. E. Mycoplasma genitalium in chronic non-gonococcal urethritis. **Int J STD AIDS**, 15, n. 1, p. 21-25, Jan 2004.

TAYLOR-ROBINSON, D.; HORNER, P. J. The role of Mycoplasma genitalium in non-gonococcal urethritis. **Sex Transm Infect**, 77, n. 4, p. 229-231, Aug 2001.

TAYLOR-ROBINSON, D.; JENSEN, J. S. Mycoplasma genitalium: from Chrysalis to multicolored butterfly. **Clin Microbiol Rev**, 24, n. 3, p. 498-514, Jul 2011.

TENG, L. J.; ZHENG, X.; GLASS, J. I.; WATSON, H. L. *et al.* Ureaplasma urealyticum biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene. **J Clin Microbiol**, 32, n. 6, p. 1464-1469, Jun 1994.

THATTE, H. S.; RHEE, J. H.; ZAGARINS, S. E.; TREANOR, P. R. *et al.* Acidosis-induced apoptosis in human and porcine heart. **Ann Thorac Surg**, 77, n. 4, p. 1376-1383, Apr 2004.

TOTH, K. F.; HARRISON, N.; SEARS, B. B. Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. **Int J Syst Bacteriol**, 44, n. 1, p. 119-124, Jan 1994.

TULLY, J. G.; TAYLOR-ROBINSON, D.; COLE, R. M.; ROSE, D. L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet**, 1, n. 8233, p. 1288-1291, Jun 1981.

UM, S. J.; RHYU, J. W.; KIM, E. J.; JEON, K. C. *et al.* Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Lett**, 179, n. 2, p. 205-212, May 2002.

USYK, M.; ZOLNIK, C. P.; CASTLE, P. E.; PORRAS, C. *et al.* Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. **PLoS Pathog**, 16, n. 3, p. e1008376, 03 2020.

UUSKÜLA, A.; KOHL, P. K. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. **Int J STD AIDS**, 13, n. 2, p. 79-85, Feb 2002.

VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H. U.; CHAN, P. K. S. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **J Gen Virol**, 99, n. 8, p. 989-990, 08 2018.

VAN KUPPEVELD, F. J.; VAN DER LOGT, J. T.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J. *et al.* Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Appl Environ Microbiol**, 58, n. 8, p. 2606-2615, Aug 1992.

VANCINI, R. G.; PEREIRA-NEVES, A.; BOROJEVIC, R.; BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 27, n. 4, p. 259-267, Apr 2008.

VERTERAMO, R.; PIERANGELI, A.; MANCINI, E.; CALZOLARI, E. *et al.* Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. **BMC Infect Dis**, 9, p. 16, 2009.

VITULA, F.; PECKOVA, L.; BANDOUCHOVA, H.; POHANKA, M. *et al.* *Mycoplasma gallisepticum* infection in the grey partridge *Perdix perdix*: outbreak description, histopathology, biochemistry and antioxidant parameters. **BMC Vet Res**, 7, p. 34, Jul 2011.

WAITES, K. B.; DUFFY, L. B.; BÉBÉAR, C. M.; MATLOW, A. *et al.* Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*. **J Clin Microbiol**, 50, n. 11, p. 3542-3547, Nov 2012.

WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clin Microbiol Rev**, 18, n. 4, p. 757-789, Oct 2005.

WALKER, J.; FAIRLEY, C. K.; BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N. *et al.* 'The difference in determinants of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium in a sample of young Australian women'. **BMC Infect Dis**, 11, p. 35, 2011.

WALKER, J.; FAIRLEY, C. K.; BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N. *et al.* Mycoplasma genitalium incidence, organism load, and treatment failure in a cohort of young Australian women. **Clin Infect Dis**, 56, n. 8, p. 1094-1100, Apr 2013.

WANG, F.; CHEN, S.; JIANG, Y.; ZHAO, Y. *et al.* Effects of ammonia on apoptosis and oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. **Mutagenesis**, 33, n. 4, p. 291-299, 10 2018.

WANG, J.; SHAO, Y.; BENNETT, T. A.; SHANKAR, R. A. *et al.* The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. **J Biol Chem**, 281, n. 49, p. 37427-37434, Dec 2006.

WANG, K.; LI, L.; ZHANG, Y.; GAO, D. Crosstalk between signaling pathways and DNA damage response. **Genome Instability & Disease**, 2019/08/08 2019.

WANG, Y.; WENG, Y.; SHI, Y.; XIA, X. *et al.* Expression and functional analysis of Toll-like receptor 4 in human cervical carcinoma. **J Membr Biol**, 247, n. 7, p. 591-599, Jul 2014.

WERNESS, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, 248, n. 4951, p. 76-79, Apr 1990.

WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H.; DIAGNOSTICIANS, M. C. A. A. V. L. **Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis**. Wiley, 1999. 9780813824918.

WOESE, C. R.; MANILOFF, J.; ZABLEN, L. B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 77, n. 1, p. 494-498, Jan 1980.

WOHLMEISTER, D.; VIANNA, D. R.; HELFER, V. E.; GIMENES, F. *et al.* Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 111, n. 2, p. 106-113, Feb 2016.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, 7, n. 1, p. 11-22, Jan 2007.

WOODWORTH, C. D.; NOTARIO, V.; DIPAOLO, J. A. Transforming growth factors beta 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. **J Virol**, 64, n. 10, p. 4767-4775, Oct 1990.

WORKOWSKI, K. A. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. **Clin Infect Dis**, 61 Suppl 8, p. S759-762, Dec 2015.

XIAOLEI, C.; TAOT, H.; ZONGLI, S.; HONGYING, Y. The role of ureaplasma urealyticum infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, 35, n. 5, p. 571-575, 2014.

YANG, X.; CHENG, Y.; LI, C. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review. **Signal Transduct Target Ther**, 2, p. 17055, 2017.

YAO, M.; LIU, X.; LI, D.; CHEN, T. *et al.* Late endosome/lysosome-localized Rab7b suppresses TLR9-initiated proinflammatory cytokine and type I IFN production in macrophages. **J Immunol**, 183, n. 3, p. 1751-1758, Aug 2009.

YAO, Z.; DI POTO, C.; MAVODZA, G.; OLIVER, E. *et al.* DNA Methylation Activates TP73 Expression in Hepatocellular Carcinoma and Gastrointestinal Cancer. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 19367, Dec 2019.

YAVLOVICH, A.; TARSHIS, M.; ROTTEM, S. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. **FEMS Microbiol Lett**, 233, n. 2, p. 241-246, Apr 2004.

YE, H.; GUO, X. TP73 is a credible biomarker for predicting clinical progression and prognosis in cervical cancer patients. **Biosci Rep**, 39, n. 8, Aug 2019.

YE, H.; SONG, T.; ZENG, X.; LI, L. *et al.* Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Arch Gynecol Obstet**, 297, n. 6, p. 1377-1387, 06 2018.

YOSHIDA, T.; DEGUCHI, T.; MEDA, S.; KUBOTA, Y. *et al.* Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction. **Sex Transm Dis**, 34, n. 6, p. 416-419, Jun 2007.

YOU, X.; WU, Y.; ZENG, Y.; DENG, Z. *et al.* *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins induce activation of MAPKs, NF-kappaB and AP-1 in THP-1 cells. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 52, n. 2, p. 228-236, Mar 2008.

YU, L.; WANG, L.; LI, M.; ZHONG, J. *et al.* Expression of toll-like receptor 4 is down-regulated during progression of cervical neoplasia. **Cancer Immunol Immunother**, 59, n. 7, p. 1021-1028, Jul 2010.

ZARIFFARD, M. R.; NOVAK, R. M.; LURAIN, N.; SHA, B. E. *et al.* Induction of tumor necrosis factor- α secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. **J Infect Dis**, 191, n. 11, p. 1913-1921, Jun 2005.

ZHAN, Q.; LORD, K. A.; ALAMO, I.; HOLLANDER, M. C. *et al.* The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. **Mol Cell Biol**, 14, n. 4, p. 2361-2371, Apr 1994.

ZHANG, H.; FANG, D. C.; LAN, C. H.; LUO, Y. H. Helicobacter pylori infection induces apoptosis in gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. **J Gastroenterol Hepatol**, 22, n. 7, p. 1051-1056, Jul 2007.

ZHANG, S.; LO, S. C. Effect of mycoplasmas on apoptosis of 32D cells is species-dependent. **Curr Microbiol**, 54, n. 5, p. 388-395, May 2007.

ZHANG, S.; WEAR, D. J.; LO, S. Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 27, n. 1, p. 43-50, Jan 2000.

ZHOU, Q.; ZHU, K.; CHENG, H. Toll-like receptors in human papillomavirus infection. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 61, n. 3, p. 203-215, Jun 2013.

ZHOU, X.; BROTMAN, R. M.; GAJER, P.; ABDO, Z. *et al.* Recent advances in understanding the microbiology of the female reproductive tract and the causes of premature birth. **Infect Dis Obstet Gynecol**, 2010, p. 737425, 2010.

ZHU, H.; SHEN, Z.; LUO, H.; ZHANG, W. *et al.* Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. **Medicine (Baltimore)**, 95, n. 13, p. e3077, Mar 2016.

ZUO, L.; SUN, H.; YU, M.; YOU, X. *et al.* *Mycoplasma genitalium* lipoproteins inhibit tumour necrosis factor α -induced apoptosis in HeLa cells. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 32, n. 6, p. 1590-1597, 2018.

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

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**, 1288, n. 2, p. F55-78, Oct 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, 384, n. 2, p. 260-265, Feb 2009.