



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

MANOEL NERES SANTOS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À
INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM CULTURA DE
MACRÓFAGOS BOVINOS**

Vitória da Conquista, BA
2017

MANOEL NERES SANTOS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À
INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM CULTURA DE
MACRÓFAGOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky
Universidade de São Paulo – USP

Vitória da Conquista, BA
2017

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

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Santos Junior, Manoel Neres

Caracterização da resposta imunológica a infecção por *Ureaplasma diversum* em cultura de macrófagos bovinos / Manoel Neres Santos Junior. - 2017.
61 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques.

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2017.

1. *Ureaplasma*. 2. Macrófago. 3. BovinosI. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Marques, Lucas Miranda. III. Timenetsky, Jorge. IV. Título.

CDU: 577.27:636.2

MANOEL NERES SANTOS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À
INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM CULTURA DE
MACRÓFAGOS BOVINOS**

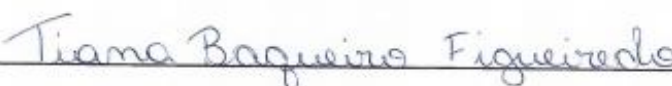
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências,
Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 10/03/2017



PROF. DR. LUCAS MIRANDA MARQUES (ORIENTADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



PROF.^a. DR.^a. TIANA BAQUEIRO FIGUEIREDO (EXAMINADORA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



PROF. DR. GUILHERME BARRETO CAMPOS (EXAMINADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Dedico este trabalho aos **meus pais** (Manoel e Sirlene),
incentivadores e conselheiro de todos os momentos. À **Nayara Neres**, pelo amor e companheirismo. À **Alice Neres** por ser o combustível que me impulsiona e por me
fazer sentir a maravilhosa sensação de ser pai.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre comigo, iluminando cada passo e por ter colocado ao meu redor pessoas tão dignas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - (FAPESB), pelo apoio financeiro concedido.

A toda minha família pelo amor, força e constante incentivo ao longo desta jornada.

Ao meu orientador, Professor Lucas Marques pela orientação, confiança, apoio, amizade e conhecimento transmitido, além de sua dedicação e competência: fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Jorge Timenetsky por ter me recebido tão bem no Laboratório de Micoplasmas do ICB/USP e pela co-orientação.

Aos professores da UFBA, em especial à Professora Regiane Yatsuda, a quem serei sempre grato por ter me mostrado os primeiros passos da pesquisa científica.

A todos do Laboratório de Micoplasma do ICB/USP, em especial a Maysa, Izadora, Verena e Regis pela recepção e ensinamentos a mim transmitidos.

Ao professor Guilherme Barreto pela recepção em sua residência em SP durante a realização de parte dos experimentos e pelas conversas e valiosas sugestões.

Ao professor Bruno Bastos pela gentileza de sempre quando solicitado dispor seu tempo para realização das coletas, fundamentais para este trabalho, e pelas conversas de percurso que sempre terminavam em boas sugestões tanto para a pesquisa quanto para a vida de modo geral.

Ao Senhor Mucio Fernando e todos seus familiares e funcionários por abrir as portas de sua propriedade rural para que importante etapa deste trabalho fosse realizada (coleta de sangue bovino) e por nos receber sempre com boa vontade.

A todos do grupo de pesquisa em microbiologia da UFBA. Agradeço infinitamente a oportunidade de fazer parte de um grupo tão consolidado e por ter me mostrado que a pesquisa científica é feita com muitos detalhes e dedicação, mas também com companheirismo, honestidade e confiança.

Aos membros da banca avaliadora por reservarem parte de seu tempo para avaliação desta dissertação.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

RESUMO

SANTOS JUNIOR, MANOEL NERES. **Caracterização da resposta imunológica à infecção por *Ureaplasma diversum* em cultura de macrófagos bovinos.** 72 f. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Ureaplasma diversum é um agente patogênico oportunista que causa grave inflamação no trato reprodutivo das vacas interferindo na reprodução bovina. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* em cultura de macrófagos bovinos. Para isto, as cepas ATCC 49782 e IC-GOTA viáveis e inativadas pelo calor e as suas respectivas lipoproteínas isoladas foram inoculadas em culturas de macrófagos na presença ou ausência de bloqueadores de sinalização do receptor tipo Toll (TLR) 2, TLR2 / 4 e do fator nuclear kappa B (NF- κ B). A concentração de óxido nítrico (NO) foi medida a partir do sobrenadante das culturas e as células foram processadas para o ensaio qPCR e a análise da expressão genética da interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), TLR2 e TLR4. As cepas ATCC 49782 e IC-GOTA (Incubação durante 6, 12 e 24 horas) e diferentes concentrações de lipoproteínas (Incubação durante 2, 6 e 12 horas) induziram maior expressão gênica em relação a culturas não infectadas. Houve também indução de secreção de NO, mostrando que esta substância pode estar envolvida na patogênese dessas bactérias. A inoculação de *U. diversum* em macrófagos bovinos na presença de bloqueadores inibiu a expressão de IL-1 β e TNF- α em todos os tratamentos. Esses dados dão fortes indícios de que *U. diversum* e suas lipoproteínas isoladas estimulam a produção de NO e interagem com TLR4 em um tipo de sinalização envolvendo TLR2, essa interação ativa NF- κ B que por sua vez atua estimulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Até a presente data não foram encontrados em bancos de dados trabalhos avaliando a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* em cultura de macrófagos bovinos. Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão da atividade imunomoduladora e da patogenicidade destes agentes infecciosos.

Palavras-chave: *Ureaplasma diversum*; macrófagos; NF- κ B; TLR.

ABSTRACT

SANTOS JUNIOR, MANOEL NERES. **Characterization of the immune response to infection by *Ureaplasma diversum* in bovine macrophages**. 72 f. Master's Dissertation – Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Ureaplasma diversum is an opportunistic pathogen that causes severe inflammation in the reproductive tract of cows interfering with bovine reproduction. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunological response generated against *U. diversum* in bovine macrophages culture. For this, the viable and heat-inactivated ATCC 49782 and IC-GOTA strains and their isolated lipoproteins were inoculated into macrophage cultures in the presence or absence of Toll-like receptor (TLR) 2, TLR2 / 4, and factor Nuclear kappa B (NF- κ B). The concentration of nitric oxide (NO) was measured from the culture supernatant and the cells were processed for the qPCR assay and analysis of the gene expression of Interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), TLR2 and TLR4. Strains ATCC 49782 and IC-GOTA (Incubation for 6, 12 and 24 hours) and different concentrations of lipoproteins (Incubation for 2, 6 and 12 hours) induced greater genetic expression in relation to uninfected cultures. There was also induction of NO secretion, showing that this substance may be involved in the pathogenesis of these bacteria. Inoculation of *U. diversum* on bovine macrophages in the presence of blockers inhibited the expression of IL-1 β and TNF- α in all treatments. These data give strong indications that *U. diversum* and their isolated lipoproteins stimulate the production of NO and interact with TLR4 in a type of signaling involving TLR2, this interaction active NF- κ B that in turn acts stimulating the expression of pro-inflammatory cytokines. To date, no studies evaluating the immunological response generated against *U. diversum* in bovine macrophages culture have been found. These results may contribute to a better understanding of the immunomodulatory activity and the pathogenicity of these infectious agents.

Keywords: *Ureaplasma diversum*; Macrophages; NF- κ B; TLR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão gênica relativa em macrófagos bovinos infectados com <i>U. diversum</i> (cepas ATCC 49782 e IC-GOTA) durante 6, 12 e 24 horas com cepas viáveis e inativas.	41
Figura 2 – Expressão gênica relativa em macrófagos bovinos infectados com <i>U. diversum</i> (cepas ATCC 49782 e IC-GOTA) durante 6, 12 e 24 horas em diferentes CCUs (<i>Ureaplasma</i> / mL).	43
Figura 3 – Gel obtido a partir da eletroforese SDS-PAGE dos LAMPsUd	44
Figura 4 – Expressão gênica em macrófagos bovinos induzida por diferentes concentrações de LAMPsUd após 2, 6 e 12 horas de inoculação.....	46
Figura 5 – Concentração indireta de NO pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos infectados com cepas de <i>U. diversum</i> e LAMPsUd após 24 horas de inoculação..	48
Figura 6 – Expressão gênica relativa de IL-1 β e TNF- α na cultura de macrófagos bovinos tratados com <i>U. diversum</i> e LAMPsUd na presença de bloqueadores de sinalização para TLR4 (CLI-095), TLR2 / 4 (OxPAPC) e NF- κ B (Celastrol).....	49
Figura 7 – (Material Suplementar 1) - Dosagem de NO pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos infectadas com cepas de ATCC 49782 ou LAMPsUd em diferentes tempos..	56
Figura 8 – (Material Suplementar 2) - Dosagem de NO pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos infectadas com cepas de IC-GOTA ou LAMPsUd em diferentes tempos..	57

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AIDS :	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
µL:	Microlitro
A:	Adenina
AP-1:	Proteína ativadora-1
ATP:	Adenosina Trifosfato
C:	Citosina
CCU:	Unidade de Mudança colorimétrica
CD:	Cluster de diferenciação
DNAC:	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK:	Quinase reguladora por estímulo extracelular
G:	Guanina
GM-SFs:	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
HeLa:	Linhagem celular humana a partir de células obtidas de câncer cervical
Hep-2:	Linhagem celular de carcinoma de laringe humano
H₃PO₄:	Ácido fosfórico
IL-1β:	Interleucina 1 beta
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
IRAK:	Quinase associada a receptor de interleucina
JNKs:	Proteína quinase c-Jun N-terminal
Kpb:	Quilo pares de bases
LAMPs:	Lipoproteínas associadas a membranas
LAMPsUd:	Lipoproteínas associadas a membranas de <i>Ureaplasma diversum</i>
LBP:	Proteína de ligação à penicilina
LPS:	Lipopolissacarídeo
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1:	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MIP-1a:	Proteína inflamatória de macrófagos-1a
MyD88:	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl:	Cloreto de Sódio
NaNO₂:	Nitrito de sódio
NF-κB:	Fator nuclear κB
nlrc5:	Receptor do tipo NOD com adaptador CARD5
NO:	Óxido nítrico
NOD:	Domínio de oligomerização nuclear
PBS:	Tampão fosfato-salina
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
pH:	Potencial hidrogeniônico
p38:	proteína quinase 38
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
RNA:	Ácido ribonucleico
rpm:	Rotação por minuto
T:	Timina
TLR:	Receptores tipo Toll
TRAF:	fator associado a receptor TNF
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alfa
TRIF:	Proteína adaptadora do domínio TIR capaz de induzir o interferon-β
UB:	Ureaplasma broth
VSPs:	Proteínas variáveis de superfície

SUMÁRIO

Introdução.....	1
1 REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1 Bovinocultura e as doenças infecciosas	3
1.2 A Classe <i>Mollicutes</i>	4
1.2.1 Patogenicidade e virulência de <i>Mollicutes</i>	6
1.2.1.1 Adesão	7
1.2.1.2 Invasão celular.....	8
1.2.1.3 Lipoproteínas Associadas a Membrana (LAMPs)	9
1.2.1.4 Proteínas variáveis de superfície (VSPs).....	9
1.2.1.5 Alguns aspectos da resposta contra <i>Mollicutes</i>	10
1.2.2 <i>Ureaplasma diversum</i>	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Micro-organismos	16
3.2 Cultivo de <i>U. diversum</i>	16
3.3 Extração e Purificação de Lipoproteínas Associadas a Membrana.....	16
3.4 Quantificação das Lipoproteínas Associadas a Membrana	17
3.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	17
3.6 Infecção de monócitos bovinos	18
3.6.1 Coleta de sangue periférico bovino	18
3.6.2 Isolamento de monócitos bovinos	18
3.6.3 Inoculação de macrófagos com <i>U. diversum</i> e lipoproteínas	19
3.6.4 Inibidores de sinalização	19
3.6.5 Extração de RNAm	20
3.6.6 Síntese de DNAc	20
3.6.7 Expressão gênica de marcadores inflamatórios.....	21
3.6.8 Dosagem de óxido nítrico	21
3.7 Análise estatística.....	21
Referências.....	22
CAPÍTULO I	30
4 MATERIAL SUPLEMENTAR	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

Introdução

A interação patógeno-hospedeiro permanece incompreendida para vários micro-organismos. Para *Mollicutes* os estudos são ainda mais escassos, o que é justificado pelas exigências nutricionais que estas fastidiosas bactérias exigem para crescimento, tornando-as de difícil cultivo laboratorial. No entanto o estudo de *Mollicutes* é de fundamental importância, visto que essa classe de bactérias possuem espécies patogênicas para homens e animais domésticos, incluído os rebanhos de importância econômica para agropecuária. A bovinocultura, em especial, é altamente prejudicada, as perdas econômicas envolvem a bovinocultura de corte e leiteira, sendo um grave problema principalmente para o pequeno produtor rural que, normalmente, carece de informações e tecnologias necessária para detectar e controlar a infecção.

Dentre os *Mollicutes* que infectam bovinos destaca-se *U. diversum*. Esta espécie do gênero *Ureaplasma* pode aderir a células do hospedeiro, competir por nutrientes, interagir e liberar compostos metabólicos. Assim, colonizam o trato respiratório e reprodutivo estando associados a uma série de quadros infecciosos que levam a infertilidade e ao aborto. Acredita-se que as interações iniciais de *U. diversum* com o hospedeiro ocorram por meio de lipoproteínas associadas a membrana - LAMPs- (MARQUES et al., 2016).

Apesar das carências de estudos envolvendo o papel das LAMPs na patogenicidade de *U. diversum* para outras espécies da Classe *Mollicutes*, essas moléculas têm sido correlacionadas com os processos de adesão e invasão celular. As LAMPs, bem com o próprio micro-organismo, estabelecem interações com TLR, sendo estas interações responsáveis por ditar a secreção de citocinas, incluindo as citocinas pró-inflamatórias (MAJUMDER; ZAPPULLA; SILBART, 2014; WANG et al., 2016). O sequenciamento do genoma de *U. diversum* revelou a existência de vários genes relacionados à patogenicidade incluindo genes envolvidos na expressão de lipoproteínas (MARQUES et al., 2015; MARQUES et al., 2016). Investigar a interação de *U. diversum* e suas LAMPs com TLRs é fundamental para o entendimento dos mecanismos imunológicos relacionados à infecção por este patógeno.

Neste sentido, estudos recentes realizados em nosso grupo de pesquisa por Rezende (2016) mostraram aumento significativo da expressão de TLR2, super-expressão do gene *nlrc5* (receptor do tipo NOD com domínio CARD5) e maior produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α após infecção de macrófagos murinos por

U. diversum. Ainda foi verificada, por microscopia confocal, a internalização dos micro-organismos em blastocistos bovinos seguido da expressão gênica significativa de IL-1 β , TNF- α e de TLR-2. Com base nestes resultados Rezende, (2016), sugeriu que o reconhecimento das LAMPs de *U. diversum* pelo TLR2 desencadearia uma cascata de sinais que ativaria o fator de transcrição NF- κ B. Assim, pró-IL-1 β , seria transcrito e exportada para o citoplasma. A invasão por *U. diversum* causaria a ativação de receptores tipo NOD. Esta série de eventos levaria a montagem do inflamassoma, que daria origem à formação de IL-1 β ativa. O Inflamassoma também provocaria aumento da síntese de prostaglandina. A associação desses fatores no ambiente uterino causaria o não reconhecimento da gestação e a não ovulação. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* e suas LAMPs em cultura de macrófagos bovinos, investigando o papel da sinalização por TLR-2 e TLR-4 bem como o papel de NF- κ B na expressão de IL-1 β , TNF- α e na produção de NO.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Bovinocultura e as doenças infecciosas

A bovinocultura tem fundamental importância para o setor agropecuário brasileiro. Neste sentido, uma das grandes preocupações das pesquisas atuais é a busca por alternativas de manejo nas diferentes categorias deste setor econômico. Essa abordagem, baseada na crescente produção de carne e na atividade leiteira, objetiva aumentar o rendimento econômico através da produtividade com qualidade (PORTELA et al., 2015). Neste cenário, o Brasil se destaca por possuir um rebanho bovino estimado em 194,84 milhões de cabeças, sendo um dos maiores rebanho comercial do mundo (PEREIRA et al., 2016; TUPY et al., 2015). Deste total cerca de 40,86 milhões é de aptidão leiteira e 153,98 milhões de aptidão para corte (ANUALPEC, 2014).

Os avanços tecnológicos têm notável participação no aumento da produção bovina (STOCK et al., 2008). O uso da inseminação artificial, transferência de embriões, produção de embriões *in vitro* e mais recentemente o uso da clonagem ou transferência nuclear com células somática trouxeram diversos benefícios à produtividade dos rebanhos (SCHMIDT, 2007). Apesar dos avanços, estas técnicas não eliminam completamente a incidência de distúrbios reprodutivos (TAVARES et al., 2015). A compreensão destes distúrbios oscila em diversas esferas, dentre tais estão o manejo sanitário e as doenças infecciosas (DEL FAVA et al., 2003).

As doenças infecciosas afetam negativamente a produção e são importantes problemas para a pecuária. Estas doenças estão, geralmente, associados a prejuízos como aumento na mortalidade de bezerros e vacas, custos com veterinários e medicamentos e transtornos reprodutivos (CARDOSO et al., 2000a; GAMBARINI et al., 2009). Muitos destes transtornos são causados por micro-organismos da classe *Mollicutes*. Estas bactérias invadem o trato genital de bovinos provocando lesões, levando à infertilidade e morte embrionária, entre outras manifestações (PETIT et al., 2008). Na Classe *Mollicutes* a espécie *U. diversum* é a única do gênero *Ureaplasma* que infecta bovinos e tem sido isolado com frequência do sistema reprodutor e respiratório destes animais (ARGUE; CHOUSALKAR; CHENOWETH, 2013; CARDOSO et al., 2000a; CARDOSO et al., 2000b; MARQUES et al., 2007; MARQUES et al., 2009). Assim, este micro-organismo apresenta potencial para gerar desordens reprodutivas,

perda de peso e redução na produção de leite. Estas desordens são associadas a significativas perdas econômicas (KUSILUKA et al., 2000).

1.2 A Classe *Mollicutes*

A Classe *Mollicutes* (*Mollis* = mole; *cútes* = pele) pertence ao Filo *Firmicutes* sendo informalmente chamado de micoplasmas ou simplesmente mollicutes. Esta Classe é composta por cerca de 200 espécies e, em geral, aproximam-se das dimensões dos menores vírus -0,2 a 0,4 μm - (RAZIN, 1992; VOS et al., 2011). No total 14 gêneros formam a Classe dos Mollicutes: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelotrix*, *Bulleidia*, *Holdemania*, *Solobacterium*, *Eperythozoon* e *Haemobartonella* – os gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma* são conhecidos por conterem as espécies que habitam os animais na condição de comensais, saprófitos ou patógenos (RAZIN, 1985; VOS et al., 2011).

A Classe *Mollicutes* aborda os menores micro-organismos de vida livre e autorreplicáveis (NEIMARK, 1986; RAZIN; HAYFLICK, 2010). O pequeno tamanho justifica o tardio isolamento dessas bactérias. (MOROWITZ, 2002; RAZIN, 1992). Estes micro-organismos têm ampla distribuição na natureza e parasitam humanos, animais, insetos e plantas (YOU; ZENG; WU, 2006). Nos animais tendem a colonizar preferencialmente as superfícies mucosas do trato respiratório, genital, orofaríngeo, oftálmico bem como a glândula mamária e articulação. Geralmente causam infecção inaparente e persistente, mantendo um estilo de vida crônico e parasitário (RAZIN, 1995).

Mollicutes possuem essencialmente a membrana celular, ribossomos e uma molécula circular de DNA dupla fita. (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Apesar de, com base na coloração de Gram, serem classificados como Gram-negativos, não apresentam parede celular, sendo por isso pleomórficos. Esta característica explica muitas propriedades peculiares dos micoplasmas, tais como a sensibilidade ao choque osmótico e a detergente e resistência natural a antibióticos que agem na síntese de parede celular (MCCORMACK, 1993; RAZIN, 1997; WAITES; CRABB; DUFFY, 2003; WESTBERG et al., 2004). A falta de parede celular não está condicionada a ausência de outras estruturas externa a membrana citoplasmática, prova disso é a descrição da presença de cápsula polissacarídica em bactérias desta classe (MARQUES, 2009), bem

como a presença do gene da glicosiltransferase - associado com a produção de cápsula - (MARQUES et al., 2015; MARQUES et al., 2016). Os *Mollicutes* parecem apresentar uma única DNA polimerase, em contraste com as três encontradas na *Escherichia coli* e apenas uma a duas cópias de genes de rRNA (MANILOFF, 1983; RAZIN, 1985).

A reprodução dos molicutes procede-se por divisão binária, porém, formas filamentosas multinucleadas já foram descritas (PILO; FREY; VILEI, 2007; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Em geral não possuem flagelos, no entanto, algumas espécies exibem deslizamento sobre superfícies líquidas ou apresentam contração celular que resultam em movimento. O cultivo pode ocorrer em meio líquido ou sólido. No meio sólido formam pequenas colônias de 50 a 500 µm que são visualizadas ao microscópio eletrônico. Em meio líquido, o crescimento provoca somente alteração no pH, revelado por um indicador presente no meio de cultura (RAZIN, 1995), por não causar turvação ao meio são importantes contaminantes de culturas celulares (HAYFLICK; STINEBRING, 1960; RAZIN; HAYFLICK, 2010). As faixas adequadas de temperatura e pH estão relacionadas com o ambiente encontrado no hospedeiro. *Mollicutes* que infectam mamíferos e aves geralmente apresentam temperatura ideal de aproximadamente 37°C (GARDELLA; DEL GIUDICE; TULLY, 1983). Em espécies originárias de plantas e vertebrados o pH ótimo é de 7,4 e o crescimento ocorre entre 6,5 e 8,0. *Ureaplasma* são exceções, sendo o pH ótimo de 5,5 a 6,0 e seu crescimento inibido em pH acima de 7,5 (RAZIN, 1997).

Com base na capacidade de metabolizar hidratos de carbono, os molicutes são divididos em fermentadores, através da metabolização de carboidratos, e em não fermentadores, que possuem a via da arginina-deidrolase para obtenção de adenosina trifosfato – ATP - (OLSON et al., 1993). Ambas as vias podem ser utilizadas por alguns micoplasmas, ainda, as vias metabólicas variam entre as espécies (MILES et al., 1994). Essas bactérias têm o ciclo de ácido tricarboxílico incompleto e também não apresentam quinonas e citocromos, descartando a possibilidade de fosforilação oxidativa eficaz como um mecanismo de geração de energia (RAZIN; HAYFLICK, 2010). *Ureaplasma* necessitam de ureia para produzir ATP através da hidrólise deste composto com consequente liberação de amônia (BASEMAN; TULLY, 1997).

O tamanho do genoma varia entre os gêneros de *Mollicutes*. Assim, estas bactérias são classificadas em dois grupos: um composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, com cerca de 580 a 1350 Kpb, e o outro formado pelos gêneros *Acholeoplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma* com 790 a 2200 Kpb (FRASER et al.,

1995). O cromossomo destas bactérias são estruturas dinâmicas, ocorrendo frequentemente rearranjos, inserções e deleções (FONSECA et al., 2007). *Mollicutes* possuem genoma de tamanho reduzido como resultado de evolução degenerativa. Apresentam alto teor de adenina (A) e timina (T) - 67% a 76% - e utilizam o códon UGA (triptofano) com códon de parada de tradução (ROTTEM, 2003; ROTTEM; NAOT, 1998; WAITES, KEN; TALKINGTON, 2004). Como consequência da redução de material genético houve perda de genes não essenciais, incluindo genes de síntese de parede celular, catabolismo e passos metabólicos (BORGES et al., 2007). Todos estes fatores explicam o complexo requerimento nutricional, incluindo requerimento de suplementos externos de muitos precursores biossintéticos como, por exemplo, aminoácidos, nucleotídeos e esteróis exógenos são utilizados para seu crescimento *in vitro* (PILO et al., 2005; RAMIREZ et al., 2008). Durante os últimos anos o genoma de várias espécies de micoplasmas foi sequenciado, incluído o genoma de *Mycoplasma gallisepticum* (PAPAZISI et al., 2003) *Mycoplasma mobile* (JAFFE et al., 2004); *Mycoplasma genitalium* (HIMMELREICH et al., 1996), *Mycoplasma hyopneumonia* (MINION et al., 2004), *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC (WESTBERG et al., 2004), *Mycoplasma pulmonis* (CHAMBAUD et al., 2001), *Ureaplasma urealyticum* (GLASS et al., 2000) e *U. diversum* (MARQUES et al., 2015). O sequenciamento revela genomas simples, contudo as doenças provocadas são complexas e relativamente desconhecidas (BAILÃO et al., 2007). Estas doenças geralmente envolvem fatores de virulência capazes de mediar vários aspectos da patogenicidade.

1.2.1 Patogenicidade e virulência de *Mollicutes*

A maior parte dos mollicutes vive como comensais e podem desenvolver relação de simbiose com alguns artrópodes (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Infecções por espécies patogênicas raramente levam a morte, no entanto, em alguns casos, o quadro clínico evolui para cronicidade (RAZIN et al., 1998). Essas bactérias colonizam os tecidos do hospedeiro gerando resposta imunológica sistêmica e local, algumas vezes causam imunodepressão e doenças autoimunes (RAZIN et al., 1998). Várias doenças de etiologia desconhecida já foram relacionadas com estas bactérias, incluindo o possível papel no agravamento da patogênese da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e outras doenças, tais como a síndrome da fadiga crônica, doença de Crohn, e diversas artrites (CHEN et al., 2015; FU et al., 2013).

A base molecular da patogenicidade ainda não foi completamente elucidada. Alguns estudos sugerem que o quadro clínico causado em humanos e animais é, em partes, provocado pela resposta inflamatória gerada pelo próprio hospedeiro (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Muitos estudos têm sido voltados para análise da superfície celular destas bactérias. A membrana celular dos mollicutes possui adesinas, LAMPs e proteínas variáveis de superfície (VSPs) que juntas representam importantes fatores de virulências. Segundo Kahane e Razin (1969) os principais determinantes antigênicos dos mollicutes estão localizados na membrana citoplasmática (KAHANE; RAZIN, 1969).

1.2.1.1 Adesão

A adesão é uma característica marcante dos mollicutes. Estas bactérias aderem firmemente aos revestimentos epiteliais das vias respiratórias ou urogenital, de onde passam a competir por nutrientes e precursores biossintéticos. Tal competição pode alterar a integridade e função da célula hospedeira. A competição pela arginina por espécies que não realizam fermentação, mas utilizam a arginina dihidrolase na geração de ATP, reduzem as reservas do hospedeiro, alterando a síntese proteica, a divisão celular e o crescimento (RAZIN; HAYFLICK, 2010; ROTTEM; NAOT, 1998). Outros mecanismos estão envolvidos na competição por precursores de ácidos nucleicos ou degradação do DNA. Desta forma os mollicutes, em virtude de requerimentos nutricionais e como consequência direta do tamanho de seu genoma, estabelecem uma complementaridade metabólica com o hospedeiro (VASCONCELOS et al., 2005).

A adesão celular é um pré-requisito para a colonização e para a infecção. A perda da capacidade de adesão por mutação resulta em perda de infecciosidade, enquanto que a reversão ao fenótipo citoaderente é acompanhada pelo retorno da infecciosidade e da virulência. (BASEMAN; TULLY, 1997; BROWNING et al., 2011; RAZIN; JACOBS, 1992). A invasão é um processo complexo que envolve adesinas de micoplasmas e receptores celulares (SHAW; FALKOW, 1988). Uma vez aderido os mollicutes interagem com os receptores de membrana ou altera o mecanismo de transporte das células hospedeiras tornando-as vulneráveis a metabólitos citotóxicos e a atividade de enzimas citolíticas produzidas pelo patógeno (ROTTEM; NAOT, 1998; SHAW; FALKOW, 1988; RAZIN, 2005). As adesinas tornam os micoplasmas extremamente específicos em relação aos tecidos que invadem.

Macromoléculas de diferentes mollicutes foram identificadas e relacionadas à adesão celular, dentre estas estão as proteínas P1 e P30 de *Mycoplasma pneumoniae* (CHANG; JORDAN; KRAUSE, 2011; SETO et al., 2001), as proteínas Maa1 e Maa2 de *Mycoplasma arthritidis* (BIRD et al., 2008) e as proteínas GapA e CrmA de *M. gallisepticum* (MUDAHI-ORENSTEIN et al., 2003). Em *Mycoplasma bovis* foram identificadas as proteínas P26 (SACHSE et al., 1996), α -enolase (SONG et al., 2012) e membros da família VSPs com função de adesão (SACHSE et al., 2000). A identificação dessas proteínas fornece subsídios para melhor compreensão dos mecanismos de patogênese destes mollicutes (ZOU et al., 2013).

1.2.1.2 Invasão celular

A capacidade de invasão por alguns mollicutes está estritamente relacionada com a adesão celular (TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011; ROTTEM, 2002). Muitos trabalhos sugerem que a invasão confere proteção contra o sistema imunológico (AMORIM et al., 2014; MARQUES, et al., 2010; YAVLOVICH; TARSHIS; ROTTEM, 2004). Este processo já foi descrito para várias espécies dentre estas estão a invasão celular por *Mycoplasma penetrans*, *M. genitalium* (DALLO; BASEMAN, 2000) e *M. gallisepticum* (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000). Trabalhos recentes comprovaram que *U. diversum* invadem células Hep-2 (MARQUES et al., 2010) e espermatozoides bovinos (BUZINHANI et al., 2011). A invasão celular é um importante fator de virulência e pode ser considerada uma estratégia para persistência em hospedeiros imunocompetentes, além de lhes propiciar nutrientes essenciais (ANDREEV et al., 1995). A localização intracelular também protege os micoplasmas contra a ação dos antibióticos e podem ser responsáveis pela difícil erradicação dos mollicutes de culturas de células infectadas (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Abordagens visando explicar os mecanismos inerentes a invasão mostraram que o plasminogênio exerce papel importante na invasão por *Mycoplasma fermentans*. Quando tratado com plasminogênio *M. fermentans* conseguiu invadir células HeLa, no entanto, quando não tratado esta bactéria perde a capacidade de invasão, mostrando a dependência do plasminogênio no processo. (YAVLOVICH et al., 2004). A enzima fosfolipases C, também está relacionada no processo. Os mollicutes utilizam fosfolipases para clivar fosfolipídios de membrana e ter acesso ao citoplasma das células hospedeiras

(ANDREEV et al., 1995; ROTTEM; NAOT, 1998; SHIBATA; SASAKI; WATANABE, 1995).

1.2.1.3 Lipoproteínas Associadas a Membrana (LAMPs)

Mollicutes possuem grande quantidade e diversidade de LAMPs, estas são consideradas os principais padrões moleculares associados à patógenos em várias espécies (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; YOU et al., 2006). A membrana destes micro-organismos possui proteínas integrais e proteínas periféricas. As proteínas integrais de membrana estão incorporadas e intimamente relacionadas à bicamada lipídica, sendo de difícil extração. Em contraste, as proteínas periféricas estão unidas à membrana principalmente por interações eletrostáticas e, portanto, podem ser liberadas facilmente. Estas proteínas periféricas externas, designadamente LAMPs pode ser extraída por meio de Triton X-114 devido à sua característica hidrofóbica (SHIBATA, et al., 2000).

As lipoproteínas estão ancoradas no envelope celular dos micoplasmas no lado externo da membrana plasmática, possibilidade contato com o hospedeiro (CHAMBAUD et al., 1999). A grande quantidade de LAMPs expressas é responsável por uma porção significativa da massa da membrana (CHAMBAUD et al., 1999; HAYASHI; WU, 1990; SUTCLIFFE, 1995). A identificação dos genes de codificação de LAMPs nos genomas revelou que o número e diversidade destas moléculas é maior do que se suspeitava anteriormente (MAJUMDER et al., 2014).

As LAMPs desempenham papel importante na infecção e na lesão de órgãos e estão envolvidas na ativação ou inibição da apoptose (HOPFE, 2008), na funcionalidade do transportador ABC (SCHMIDT; BROWNING; MARKHAM, 2007), na virulência de diferentes cepas (VILEI et al., 2000; VILEI; FREY, 2001) e na adesão celular (BOLLAND; DYBVIG, 2012; SACHSE et al., 2000).

1.2.1.4 Proteínas variáveis de superfície (VSPs)

Adicionalmente, os micoplasmas possuem lipoproteínas que são VSPs, pois sofrem constantes variações (CHAMBAUD et al., 1999; DAVIS; WISE, 2002). Uma variedade de mecanismos está envolvida nestas variações antigênica, incluindo variação de fase (RÖSKE et al., 2001); variação no número de repetições em tandem no terminal

carboxílico (SIMMONS; DYBVIG, 2003; TU et al., 2005), mascaramento por outro antígeno de superfície (ZHANG; WISE, 2001) e proteólise específica de regiões da lipoproteína (DAVIS; WISE, 2002).

Mollicutes patogênicos utilizam estes mecanismos para uma adaptação rápida às mudanças do microambiente. A modificação dos principais antígenos de membrana fornece uma saída eficaz da rápida destruição pelo sistema imune do hospedeiro (CARTNER et al., 1996). Segundo Razin et al. (1998) e Yogev et al. (2002) Este mecanismo compensa a sensibilidade à lise por anticorpos e sistema complemento ocasionada pela ausência da parede celular.

A relação das variações antigênicas com a fuga do sistema imunológico não se aplica a todos *Mollicutes*. Jensen et al. (1998) verificaram que *Mycoplasma hominis* não apresentaram nenhuma variação antigênica no decorrer do tempo quando avaliada em um mesmo indivíduo. Em contraste, isolados obtidos de pacientes diferentes mostraram um grau elevado de variação. Assim, a variação antigênica em *M. hominis* parece ser um meio de adaptação a um hospedeiro específico, e não uma forma de escapar da resposta imunológica. Desta forma, a variação de proteínas de superfície pode ser considerada um mecanismo mais geral. Este ponto de vista é suportado pelo fato de que a variação da superfície também ocorre em micro-organismos que não são expostos ao sistema imunológico do hospedeiro (DEITSCH; MOXON; WELLEMS, 1997).

1.2.1.5 Alguns aspectos da resposta contra *Mollicutes*

Os TLRs são os receptores de superfície celular de macrófagos para LAMPs de *Mollicutes* (RAWADI, 2000). Estes receptores são altamente conservados entre vertebrados e invertebrados (ROCK et al., 1998; BUWITT-BECKMANN et al., 2005; SHIMIZU; KIDA; KUWANO, 2005). De modo geral as interações dos TLRs (domínio extracelular) com seus ligantes levam ao recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras com domínio N-terminal TIR, tais como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a proteína adaptadora capaz de induzir interferon- β (TRIF). Este processo resulta no recrutamento de proteínas da família de quinases associada a receptor de interleucina (IRAK) e do fator associado a receptor TNF (TRAF) gerando a ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), JUN N-terminal (JNKs), proteína quinase 38 (p38) e quinase reguladora por estímulo extracelular (ERK). Esta sinalização culmina na ativação de fatores de transcrição incluindo NF- κ B e proteína

ativadora-1 (AP-1) que são essenciais para a indução da resposta imune inata e adaptativa (AKIRA, 2006; KAWAI; AKIRA, 2007). No total 13 TLRs já foram identificados em mamíferos e são críticos na sinalização por padrões moleculares associados a patógeno, tais como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos e LAMPs (AKIRA et al., 2001; KAWAI; AKIRA, 2010).

Resultados obtidos por Schroder et al. (2004) mostraram que a resposta celular a LAMPs de mollicutes é facilitada pela molécula de superfície monocitária CD14 (Cluster de Diferenciação 14). Adicionalmente, a LBP (Proteína de ligante de LPS) também está envolvida na indução de citocinas por LAMPs. O mecanismo possível é que as lipoproteínas sejam ligadas ao LBP e transferidas para CD14, o complexo LAMPs-LBP-CD14 facilita o reconhecimento destes por TLR2 em sinergia com TLR6. Apesar dos estudos de Schroder et al. (2004) as vias de sinalização, induzidas por LAMPs parece variar entre as espécies. Para diferentes *Mollicutes* a sinalização é mediada por diferentes TLRs agindo na ativação de NF- κ B AP-1 culminando na produção de citocinas (GARCIA et al., 1998; RAWADI et al., 1999). Geralmente a ativação de NF- κ B e AP-1 ocorrem através de uma via dependente de MyD88 (HE et al., 2009). O gene da IL-1 β , regulada pela via de sinalização NF- κ B, é um importante gene associado à inflamação que é superespresso durante muitos tipos de infecção patogênica (ARTHUR; LEY, 2013; KAWAI; AKIRA, 2007).

A interação de *Mollicutes* com TLRs estimulam monócitos, macrófagos e astrócitos cerebrais e induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 e IL-6, quimiocinas, tais como IL -8, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos-1a (MIP-1a), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-SFs), bem como prostaglandina e NO (RAZIN et al., 1998). Estas moléculas estão associadas a forte resposta inflamatória.

No entanto, além de desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, As LAMPs também podem regular de forma descendente a inflamação. Como postulado, LAMPs derivados de *M. fermentans* induz produção de IL-10 em monócitos humanos (RAWADI; ROMAN-ROMAN, 1996). A IL-10 tem como característica regular negativamente a resposta imunológica (ROTTEM, 2003).

Quanto ao desenvolvimento da resposta imunológica foi verificado que em frangos infectadas com *M. gallisepticum* ocorre uma resposta inicial dominada por linfócitos CD8 +, que, após a primeira semana, são gradualmente substituídos por linfócitos CD4 +, e mais tarde predominam os linfócitos B (GAUNSON et al., 2006),

sugerindo o desenvolvimento de uma resposta adaptativa crônica. Outros estudos apontam que várias espécies de micoplasmas são ativadores policlonais de linfócitos B e linfócitos T *in vivo* e *in vitro* com consequente secreção de imunoglobulinas, opsonização por anticorpos e sistema complemento além da formação de infiltrado com presença de neutrófilos e macrófagos nos locais de infecção (SIMECKA et al., 1993; HWANG et al., 2008; REYES et al., 2006; THANAWONGNUWECH et al., 2001).

1.2.2 *Ureaplasma diversum*

O gênero *Ureaplasma* contém micro-organismos que infectam animais e humanos. Por pertencerem à classe dos *Mollicutes* os ureaplasmas compartilham as características gerais desta Classe. Assim, *Ureaplasmas* são pleomórficos, microaerófilas e possuem temperatura ótima de crescimento de 37°C, mas podem crescer entre 22°C e 42°C. O pH ideal de crescimento varia de 5,5 a 6,0. Em meio sólido produzem colônias de 15 a 60 µm. A produção de amônia através da hidrólise da uréia é uma característica marcante dos ureaplasmas e os diferenciam de outras bactérias (PARALANOV et al., 2012; RAZIN; HAYFLICK, 2010).

U. diversum é um micro-organismo intracelular facultativo e, como acontece em outros mollicutes, a doença causada é multifatorial (BUZINHANI et al., 2011; SANDERSON; CHENOWETH, 1999). Geralmente é isolado do trato genital de bovinos e provoca distúrbios genitais (BUZINHANI et al., 2011; MARQUES et al., 2009). Apesar de não possui parede celular, externamente a membrana citoplasmática de *U. diversum* há uma capsula formada por arabinose, xilose, manose, galactose e glicose. O sequenciamento do genoma de *U. diversum* identificou um genoma de 973, 501 bp com genes envolvidos na formação da capsula e de outros fatores de virulência (MARQUES et al., 2016).

A infecção por estas bactérias não está condicionada a presença de sintomatologia clínica, visto que os primeiros isolados foram em vacas aparentemente saudáveis (TAYLOR-ROBINSON; HAIG; WILLIAMS, 1967). No entanto, atualmente há vários estudos associando *U. diversum* a uma série de distúrbios reprodutivos em bovino (BUZINHANI et al., 2007; BUZINHANI et al., 2011; CARDOSO et al., 2000a; CARDOSO et al., 2000b; MARQUES et al., 2009; MAUNSELL; DONOVAN, 2009). *U. diversum* é considerado um patógeno oportunista encontrado nas mucosas e secreções da vulva, vagina e úbere, associado à ocorrência de graves quadros

inflamatórios (CARDOSO et al., 2000a; CHELMONSKA-SOYTA, A. et al., 2001). A severa vulvovaginite granular, salpingite, endometrite, mastite, placentite e alveolite fetal ocasionada muitas vezes resultar em aborto ou nascimento de bezerros fracos (CARDOSO et al., 2000b; HOWARD; GOURLAY; BROWNLIE, 1973; PETIT et al., 2008; RAE et al., 1993; ROTTEM, 2003). A liberação de amônia pela hidrólise da ureia, por uma uréase, provavelmente afeta tecidos adjacentes aos ureaplasmas. Além disso, quando infecta um tecido, estas bactérias induzem a redução de prostaglandina pelas células do endométrio. As prostaglandinas são necessárias para a implantação e manutenção da gestação (KIM; QUINN; FORTIER, 1994).

Com relação à prevalência Petit et al. (2008) observou a presença de *U. diversum* em 12% de amostras de swab cervical e em 36% de swab vaginal de vacas. No Brasil, A presença de *U. diversum* variou de 23% a 52,9% em rebanhos que apresentavam problemas reprodutivos, sendo de 38,8% a prevalência em vacas que apresentavam vulvovaginite (BUZINHANI et al., 2007; CARDOSO et al., 2000a; CARDOSO et al., 2000b). Apesar de pouco explorado, *U. diversum* pode estar relacionado com distúrbios respiratórios. No Brasil, Marques et al. (2007) detectaram este micro-organismo em 8,22% das amostras de muco nasal de bezerros sadios e em 31,6% de amostras coletadas em animais apresentando distúrbios respiratórios.

Em touros *U. diversum* está envolvido em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite e outras patologias por alterações morfológicas e funcionais nos espermatozoides (BUZINHANI et al., 2011; HOBSON; CHOUSALKAR; CHENOWETH, 2013). Um das principais formas de transmissão é o contágio direto pelo coito, onde touros infectados disseminam por meio da monta natural ou inseminação artificial (BRITTON et al., 1987; MILLER et al., 1994). Assim espermatozoides infectados são importantes formas da transmissão dos agentes.

Invasão celular por *U. diversum* já foi descrita. Marques et. al., (2010), utilizando Microscopia Confocal, detectaram invasão de *U. diversum* em células Hep-2 um minuto após a infecção, observações feitas após 3, 8 e 12 horas detectaram micro - organismos em torno das regiões perinucleares. A detecção de *U. diversum* internalizados em espermatozoides bovinos descrita por Buzinhani et al. (2011) enfatiza o papel desses micro-organismos na redução da motilidade espermática, vesiculite seminal e epididimite.

Estudos avaliando a capacidade *U. diversum* induzir apoptose celular verificaram que após inoculação em cultura de células Hep-2 o número de células

apoptóticas foi maior do que as células não infectadas. No entanto, o número de células apoptóticas diminuiu ao longo do tempo. Tal redução pode estar relacionada com a persistência deste micro-organismo no ambiente intracelular no qual pode ser protegido dos fatores imunitários do hospedeiro (AMORIM et al., 2014).

A capacidade de induzir a produção de citocinas, tais como TNF- α IL-1 e NO revela o potencial de *U. diversum* na geração de resposta inflamatória. (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994; SILVA et al., 2016). Na literatura atual não há pesquisas correlacionando as interações de LAMPs deste micro-organismo com TLRs durante a infecção. No entanto o sequenciamento do genoma de *U. diversum* revelou a presença de genes codificadores de um grande número de lipoproteínas e genes responsáveis por variação antigênica (MARQUES et al., 2015; MARQUES et al., 2016). Assim estes estudos dão indício de que LAMPs podem desempenhar importante papel durante a infecção e no desencadeamento dos fatores de virulência e patogenicidade de *U. diversum*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* e suas LAMPs em cultura de macrófagos bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar LAMPs de *U. diversum* e verificar seu papel na indução da expressão de genes pró-inflamatórios.
- Analisar a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória em macrófagos bovinos infectados com diferentes inóculos de *U. diversum* e diferentes concentrações de LAMPs.
- Determinar o papel de TLR2, TLR4 e NF- κ B durante a infecção de cultura de macrófagos infectados por *U. diversum* e suas LAMPs.
- Verificar a indução da produção de NO em macrófagos bovinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Duas cepas de *U. diversum* foram utilizadas: um isolado clínico obtido do muco vulvo-vaginal de uma fêmea bovina em São Paulo (IC-GOTA) e a cepa de referência ATCC (49782). Os micro-organismos foram gentilmente doados pelo Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

3.2 Cultivo de *U. diversum*

As cepas foram cultivadas em Meio *Ureaplasma* (UB) (RUHNKE e ROSENDAL, 1994), líquido e sólido. Os subcultivos foram realizados inoculando-se 1 mL do estoque congelado a -70°C em 9 mL de meio líquido, incubados a 37°C, em aerobiose. As culturas foram separadas em alíquotas de 1 mL e congeladas a -70°C. Foi realizada PCR espécie-específica com os primers UD3 e UD4 para confirmação da espécie *U. diversum* (CARDOSO et al., 2000a). Cada alíquota de bactéria estocada foi novamente subcultivada em 9 mL em caldo UB e expandidas até o volume final de 200 mL. O crescimento foi caracterizado pela alcalinização do meio pela hidrólise da ureia utilizando-se como indicador de pH o vermelho de fenol. No meio sólido, observou-se a formação de pequenas colônias granulosas com aproximadamente 500 µm e de coloração marrom escuro, resultante da precipitação de cátions de manganês pela atividade da urease (RUHNKE e ROSENDAL, 1994).

A quantificação do inóculo bacteriano (10^6 , 10^5 e 10^4 *Ureaplasma*/mL para ATCC 49872 e 10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL para IC-GOTA) foi realizada por diluição decimal para a determinação da Unidade de Mudança Colorimétrica (“Color Change Unit” - CCU). Tal método consiste no cultivo em diluição decimal seriada em meio líquido com o indicador colorimétrico para mensurar os títulos de crescimento do micro-organismo. A última diluição que apresenta crescimento é considerada como CCU. (TAYLOR-ROBINSON, 1983). Parte do inóculo (referente ao maior CCU de cada cepa) foi destinada à inativação de calor em banho-maria a 100 ° C por 30 minutos.

3.3 Extração e purificação de lipoproteínas associadas a membrana

A preparação das LAMPs seguiu a metodologia descrita por He et al. (2009). Duzentos mililitros de *U. diversum* (CCU de 10^4 ureaplasma/mL) foi centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos a 4 °C, sendo o sedimento lavado 2 vezes em PBS (1x) e em seguida, novamente centrifugado 15000 rpm, 15 minutos a 4°C para remoção do meio de cultura. Após lavagem o sedimento foi ressuscitado em 5 mL de Tris-EDTA, seguido da adição de Triton TX-114 a uma concentração final de 2%. Após homogeneização a mistura foi incubada a 48°C por 60 minutos para formação do lisado. O lisado foi incubado a 37 °C durante 10 minutos para a separação das fases. Após centrifugação a 14000 rpm a 25°C durante 20 minutos, a fase aquosa superior foi removida e a fase orgânica foi completada para o volume de 1 mL por adição de tris-EDTA. Posteriormente foi adicionado de 2,5 ml etanol (gelado a -4°C) e deixado overnight a -20°C, para ocorrer a precipitação das LAMPs. O material precipitado foi centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o excesso de álcool foi intencionalmente evaporado. As LAMPs foram ressuscitadas em PBS (1x) e estocadas a -80°C para experimentos posteriores.

3.4 Quantificação das lipoproteínas associadas a membrana

A quantificação das LAMPs foi realizada pelo ensaio fluorimétrico Qubit® 2.0 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, para cada microtubo, foram adicionados 10µl mais 190 µL de solução de trabalho do Qubit contendo o reagente fluoróforo. Estes foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos; e em seguida, a leitura da absorbância das amostras foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A leitura de um branco, contendo apenas PBS (1x) foi realizada de maneira similar às amostras. Já a curva padrão foi obtida através da leitura de três padrões contidos no kit, preparados também de forma semelhante, sendo volumes do padrão de 10 µL e da solução de trabalho do Qubit de 190 µL.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O gel de separação foi preparado com acrilamida/bisacrilamida 12% em tampão contendo 2 mL de Tris/HCl (pH 8,8); 100µL de SDS 10%; 3,35 mL de água destilada; 50µL de persulfato de amônio (0,1g/mL) e 5µL de TEMED. No gel de empilhamento os constituintes foram ajustados para formulação de um gel de acrilamida/bisacrilamida

5% (2M/ 0,02 M). Os géis foram aplicados na cuba e após solidificação os poços formados foram cobertos com solução tampão de corrida preparado com Tris/Glicina/SDS (0,3 M/2,87M/0, 052M) em água destilada como descrito por Laemmli (1970). Dez microlitros de cada amostra (23,0 µg/mL de LAMPs de ambas as cepas) foram dissolvidos em mesmo volume de solução tampão (Tris pH 6, 8; Glicerol; SDS; B-mercaptoetanol; Bromofenol Blue; H₂O destilada) em seguida, aqueceu-se a 100°C em banho-maria por 5 minutos. Foram injetados 15 µL de amostra por poço. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular Novex Protein. A voltagem utilizada foi de 80 V no gel de empilhamento e de 200 V no gel de separação. Após o fim da corrida o gel foi retirado da cuba e transferido para um recipiente contendo a solução corante (1g de azul brilhante de; 400 mL de metano; 100 mL de ácido acético e 500 mL de água destilada) e deixado em agitador por 30 minutos a 50°C. Em seguida, removeu-se a solução corante e a solução descorante foi adicionada (500 mL de metanol; 200 mL de ácido acético e água destilada suficiente para 1.300 mL). O gel permaneceu na solução descorante overnight e posteriormente foi analisado quanto a presença de bandas.

3.6 Infecção de monócitos bovinos

3.6.1 Coleta de sangue periférico bovino

Coletas de sangue periférico bovino foram realizadas por médico veterinárias certificado e de acordo com as disposições de ética para pesquisa animal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto multidisciplinar em saúde – da Universidade Federal da Bahia nº 027/2015. As amostras foram coletadas em tubos vacutainer com EDTA através de punção venosa da veia jugular (GONDAIRA et al., 2015). As amostras foram imediatamente levadas ao laboratório e processadas para isolamento de monócitos.

3.6.2 Isolamento de monócitos bovinos

O sangue periférico foi diluído na proporção 1:1 com PBS (1x; pH 7,4) e 10 mL da diluição foram adicionadas sobre 3 mL de Ficoll-Histopaque (densidade: 10771) formando a barreira do Ficoll -Histopaque. O material foi centrifugado a 2500 rpm à

temperatura ambiente por 20 minutos e as células mononucleares, presentes na interface Ficoll/plasma, passaram por 2 lavagens com PBS (1x) e foram centrifugadas a 1250 rpm por 10 minutos. Para isolamento dos monócitos as células mononucleares foram ressuspensas em uma solução A (5 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino) e esta solução foi lentamente adicionada a 5 mL de solução B (5 mL de RPMI + 4,75mL de Percoll + 0,325 mL de PBS 10x). Esta mistura foi centrifugada por 30 minutos, 1500 rpm, 20°C. Os monócitos presentes na interface formadas entre as soluções foram coletados e o pellet contendo os linfócitos foi desprezado. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripan 0,1%. Após contagem a concentração celular foi ajustada para 4×10^5 célula/mL por meio da adição PPMI suplementado (10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e bicarbonato) (CRUZ, 2010). As culturas foram utilizadas 24 horas após o isolamento. A diferenciação de monócitos em macrófagos aderentes foi confirmada por microscopia (ALMEIDA et al., 1992; GONDAIRA et al., 2015).

3.6.3 Inoculação de macrófagos com *U. diversum* e lipoproteínas

Macrófagos bovinos foram incubados com as cepas ATCC 49782 e IC-GOTA viáveis e inativadas (100°C por 30 minutos) e em diferentes CCUs (10^6 , 10^5 e 10^4 Ureaplasma/mL para ATCC 49782 e 10^5 , 10^4 e 10^3 Ureaplasma/mL para IC-GOTA). As células também foram incubadas com LAMPs de ATCC 49782 e IC-GOTA nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 µg/mL. Todos os tratamentos foram incubados em diferentes tempos. Como controle negativo os macrófagos foram inoculados com 100 µL de PBS (1x). O controle positivo consistiu na inoculação de 100µg/mL de LPS na cultura. Após o tempo de cultivo o sobrenadante dos poços foi congelado a -70 °C para realização da dosagem de NO. As células foram lavadas removidas da placa de cultivo ressuspensa em RNAlater™ e congeladas a -70 °C para posterior extração de RNAm.

3.6.4 Inibidores de sinalização

Os macrófagos bovinos foram incubados com as cepas ATCC 49782 (10^5 Ureaplasma/mL) e IC-GOTA (10^3 Ureaplasma/mL) e com as LAMPs (2,0 µg/mL) na presença de inibidores de sinalização (MAJUMDER et al., 2014). Os inibidores da sinalização de TLR-2/4 (OxPAPC), de TLR-4 (CLI-095) e de NF-κB (Celastrol) foram

adquiridos da Invivogen (Invivogen, San Diego, CA) e utilizados conforme as instruções do fabricante. Resumidamente as células foram co-incubadas com 30 µg/mL de OxPAPC e *U. diversum* ou LAMPs durante 6 horas. Para o CLI-095 as células foram previamente pré-incubadas com 1 µg/mL de inibidor por 6 horas com posterior inoculação de *U. diversum* ou LAMPs por mais 6 horas. Para o Celastrol (5 µM), macrófagos bovinos foram pré-incubado durante 30 minutos e posteriormente foi inoculado *U. diversum* ou LAMPs seguido de incubação por 6 horas. Para controle negativo as células foram co-incubadas com 100 µL PBS (1x) e o controle positivo consistiu na inoculação das cepas ou LAMPs em cultura na ausência de bloqueadores.

3.6.5 Extração de RNAm

O RNAm das células foi extraído utilizando o TRIZOL®, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e incubadas com 1,0 mL de Trizol à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Duzentos microlitros de clorofórmio foram adicionados, incubado a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação e separação, 600 µL da fase aquosa (contendo o RNAm) foi coletado e, sobre esta fase, foi adicionado igual volume de álcool 70%. A amostra preparada foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um microtubo. Após centrifugação e descarte do líquido drenado a coluna foi lavada com tampões de lavagem. Posteriormente a coluna foi transferida para outro microtubo e foi adicionando 30 µL de H₂O livre de RNase (eluente). A coluna spin foi centrifugada, descartada e o RNAm eluído foi quantificado em NanoDrop e armazenado a e imediatamente processado para síntese de DNAC.

3.6.6 Síntese de DNA complementar (DNAC)

A síntese de DNAC foi realizada por meio da reação de transcriptase reversa utilizando o kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen- Life Technologies). Ao RNAm foi adicionado um mix A (1 µL de oligo dT, 1 µL de dNTP (10 mM) e água livre de RNase para um volume final de 12 µL) e depois incubado a 60 °C por 1 minuto seguido de centrifugação de 14000 rpm por 30 segundos. Posteriormente foi adicionado o mix B (1 µL de tampão 10X First-Strand, 2 µL de DTT, 1 µL de RNaseOUT™, 1 µL

de SuperScript™ III RT) e as amostras incubadas em termociclador a 50 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos. O DNAC foi armazenado a -70 °C para posterior análise da expressão gênica.

3.6.7 Expressão gênica de marcadores inflamatórios

A partir do o DNAC sintetizado, foi realizado RT² qPCR Primer Assay, com *primers* específicos para avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1 β e TNF- α e dos TLRs 2 e 4. A reação foi realizada por meio do StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil) e utilizando o programa recomendado pelo fabricante. A curva de Melting foi avaliada ao final da reação para observar a especificidade da amplificação. Os dados foram analisados pelo método comparativo ($2^{\Delta\Delta C_t}$) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

3.6.8 Dosagem de óxido nítrico

Para a dosagem do NO, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO²⁻), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se a uma microplaca 50 μ l do sobrenadante de culturas, seguido do mesmo volume do reagente de Griess (composto 1:1 sulfanilamida 1% diluída em H₃PO₄ 2,5% e de N-1-naphtylethtylenodiamina, também diluído em solução de H₃PO₄ a 2,5%). Na mesma placa, para confecção da curva padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μ M passou por diluições seriadas (fator 2) em meio RPMI. Após incubação da placa por 10 minutos, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 440 nm. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão de NaNO₂ cujos valores utilizados para cálculo foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram representados como média mais desvio padrão. As comparações múltiplas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguidos do pós-teste de Dunn. Todas as análises foram feitas com o auxílio do

software GraphPad-Prism (GraphPad Software, san Diego, CA-USA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de p igual ou menor a 0,05, utilizando intervalo de confiança de 95%.

Referências

- AKIRA, S. TLR signaling. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 311, p. 1-16, 2006.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature immunology**, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.
- AMORIM, A. T. et al. Apoptosis in HEP-2 cells infected with *Ureaplasma diversum*. **Biol Res**, v. 47, p. 38, 2014.
- ANDREEV, J. et al. Invasion of HeLa cells by *Mycoplasma penetrans* and the induction of tyrosine phosphorylation of a 145-kDa host cell protein. **FEMS Microbiol Lett**, v. 132, n. 3, p. 189-94, 1995.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira 2014**. 2014.
- ARGUE, B.; CHOUSALKAR, K. K.; CHENOWETH, P. J. Presence of μL in the Australian cattle population. **Aust Vet J**, v. 91, n. 3, p. 99-101, 2013.
- ARTHUR, J. S.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 679-92, 2013.
- BAILÃO, A. M. et al. Kinases of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*: an overview. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 219-224, 2007.
- BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.
- BIRD, D. W. et al. Mutation of two *Mycoplasma arthritidis* surface lipoproteins with divergent functions in cytoadherence. **Infect Immun**, v. 76, n. 12, p. 5768-76, 2008.
- BOLLAND, J. R.; DYBVIK, K. *Mycoplasma pulmonis* Vsa proteins and polysaccharide modulate adherence to pulmonary epithelial cells. **FEMS Microbiol Lett**, v. 331, n. 1, p. 25-30, 2012.
- BORGES, C. L. et al. Identification of the GTPase superfamily in *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 212-218, 2007.
- BRITTON, A. P. et al. In vitro exposure of bovine morulae to *Ureaplasma diversum*. **Can J Vet Res**, v. 51, n. 2, p. 198-203, 1987.
- BROWNING, G. et al. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. **Vet Microbiol**, v. 153, n. 1, p. 44-50, 2011.
- BUWITT-BECKMANN, U. et al. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. **European journal of immunology**, v. 35, n. 1, p. 282-289, 2005.
- BUZINHANI, M. et al. Genotyping of *Ureaplasma diversum* isolates using pulsed-field electrophoresis. **Vet J**, v. 173, n. 3, p. 688-90, 2007.
- BUZINHANI, M. et al. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozooids. **BMC Res Notes**, v. 4, p. 455, 2011.

- CARDOSO, M. V. et al. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. **Vet Microbiol**, v. 72, n. 3-4, p. 241-50, 2000a.
- CARDOSO, M. V. et al. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. **Anim Reprod Sci**, v. 63, n. 3-4, p. 137-43, 2000b.
- CARTNER, S. C. et al. Resistance to mycoplasmal lung disease in mice is a complex genetic trait. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5326-5331, 1996.
- CHAMBAUD, I. et al. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 10, p. 2145-2153, 2001.
- CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. **Trends Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 493-499, 1999.
- CHANG, H. Y.; JORDAN, J. L.; KRAUSE, D. C. Domain analysis of protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence and gliding motility. **J Bacteriol**, v. 193, n. 7, p. 1726-33, 2011.
- CHELMONSKA-SOYTA, A. et al. The effect of *Ureaplasma diversum* activated mononuclear leukocytes on the development and interferon-tau production by bovine IVF-derived embryos. **J Reprod Immunol**, v. 51, n. 2, p. 145-58, 2001.
- CHELMONSKA-SOYTA, A. et al. Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 4, p. 275, 1994.
- CHEN, L. et al. Study of *Mycoplasma pirum* infection and related factors among male HIV/AIDS patients. **Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 36, n. 8, p. 825-828, 2015.
- CRUZ, W. A. D. S. **Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas**. 2010. 57 Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP).
- DALLO, S. F.; BASEMAN, J. B. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. **Microb Pathog**, v. 29, n. 5, p. 301-9, 2000.
- DAVIS, K. L.; WISE, K. S. Site-specific proteolysis of the MALP-404 lipoprotein determines the release of a soluble selective lipoprotein-associated motif-containing fragment and alteration of the surface phenotype of *Mycoplasma fermentans*. **Infect Immun**, v. 70, n. 3, p. 1129-35, Mar 2002.
- DEITSCH, K. W.; MOXON, E. R.; WELLEMS, T. E. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 3, p. 281-293, 1997.
- DEL FAVA, C. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semintensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.
- FONSECA, M. M. et al. A model for the RecA protein of *Mycoplasma synoviae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 290-295, 2007.
- FRASER, C. M. et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 197, 1995.
- FU, M. et al. Effects of *Ureaplasma urealyticum* lipid-associated membrane proteins on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 5, p. 1655-1670, 2013.
- GAMBARINI, M. L. et al. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: role of *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma diversum* and BHV-1. **Trop Anim Health Prod**, v. 41, n. 7, p. 1421-6, 2009.

GARCIA, J. et al. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF- κ B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 51, p. 34391-34398, 1998.

GARDELLA, R.; DEL GIUDICE, R.; TULLY, J. **Immunofluorescence. F 7: 431-440. Methods in Mycoplasmaology. Vol. 1:** Academic Press, New York 1983.

GLASS, J. I. et al. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 757-762, 2000.

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

HAYASHI, S.; WU, H. C. Lipoproteins in bacteria. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 22, n. 3, p. 451-471, 1990.

HAYFLICK, L.; STINEBRING, W. R. Intracellular growth of pleuropneumonia like organisms (PPLO) in tissue culture and in ovo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 79, n. 10, p. 433-449, 1960.

HE, J. 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**, v. 16, n. 12, p. 1750-7, 2009.

HIMMELREICH, R. et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 22, p. 4420-4449, 1996.

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

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

HOWARD, C.; GOURLAY, R.; BROWNLIE, J. The virulence of T-mycoplasmas, isolated from various animal species, assayed by intramammary inoculation in cattle. **Journal of hygiene**, v. 71, n. 01, p. 163-170, 1973.

JAFFE, J. D. et al. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Res**, v. 14, n. 8, p. 1447-1461, 2004.

JENSEN, L. T. et al. Antigenic and genomic homogeneity of successive *Mycoplasma hominis* isolates. **Journal of medical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 659-666, 1998.

KAHANE, I.; RAZIN, S. Immunological analysis of *Mycoplasma* membranes. **J Bacteriol**, v. 100, n. 1, p. 187-194, 1969.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 11, p. 460-9, Nov 2007.

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

KIM, J. J.; QUINN, P. A.; FORTIER, M. A. *Ureaplasma diversum* infection in vitro alters prostaglandin E2 and prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells without affecting cell viability. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1528-33, 1994.

KUSILUKA, L. J. et al. Genetic variations among *Mycoplasma bovis* strains isolated from Danish cattle. **FEMS Microbiol Lett**, v. 192, n. 1, p. 113-8, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MAJUMDER, S.; ZAPPULLA, F.; SILBART, L. K. *Mycoplasma gallisepticum* Lipid Associated Membrane Proteins Up-regulate Inflammatory Genes in Chicken Tracheal Epithelial Cells via TLR-2 Ligation through an NF- κ B Dependent Pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. 2016

MANIHOFF, J. Evolution of wall-less prokaryotes. **Annu Rev Microbiol**, v. 37, p. 477-99, 1983.

MARQUES, L. et al. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of calves in Brazil. **Veterinary Record**, v. 161, n. 20, p. 699, 2007.

MARQUES, L. M. et al. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. **Vet Rec**, v. 165, n. 19, p. 572-3, 2009.

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

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

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

MARQUES, L. M. **Estudo da variabilidade genética e dos fatores de virulência de isolados de *Ureaplasma diversum***. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. doi: 10.11606/T.42.2009.tde-29102009-083217. Acesso em: 2016-11-01.

MAUNSELL, F. P.; DONOVAN, G. A. *Mycoplasma bovis* Infections in young calves. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 25, n. 1, p. 139-77, 2009.

MCCORMACK, W. M. Susceptibility of mycoplasmas to antimicrobial agents: clinical implications. **Clin Infect Dis**, v. 17 Suppl 1, p. S200-1, 1993.

MILES, R. et al. Diversity of energy-yielding metabolism in *Mycoplasma spp.* **IOM Lett**, v. 3, p. 165-166, 1994.

MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. J. **Methods in molecular biology Mycoplasma protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 336 p, 1998.

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

MINION, F. C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **J Bacteriol**, v. 186, n. 21, p. 7123-7133, 2004.

MOROWITZ, H. J. Foreword: From the enigmatic pleuropneumonia-like organisms to the paradigmatic *Mycoplasma*. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R4. (Eds.). **Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, P. 5 – 8, 2002.

MUDAHI-ORENSTEIN, S. et al. Cytadherence-deficient mutants of *Mycoplasma gallisepticum* generated by transposon mutagenesis. **Infect Immun**, v. 71, n. 7, p. 3812-20, 2003.

MÜHLRADT, P.; FRISCH, M. Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. **Infect Immun**, v. 62, n. 9, p. 3801-3807, 1994.

NEIMARK, H. Origin and evolution of wall-less prokaryotes. **The bacterial L-forms**, p. 21-42, 1986.

- OLSON, L. D. et al. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism: a ^{13}C -NMR study. **FEMS Microbiol Lett**, v. 108, n. 1, p. 47-52, 1993.
- PAPAZISI, L. et al. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2307-2316, 2003.
- PARALANOV, V. et al. Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. **BMC Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 88, 2012.
- PEREIRA, L. C. et al. Avaliação da Viabilidade para Produção de Bezerro de Corte a Partir dos Centros de Custo. **REPAE-Revista de Ensino e Pesquisa em Administração e Engenharia**, v. 1, n. 2, p. 187-209, 2016.
- PETIT, T. et al. Prevalence of *Chlamydiaceae* and *Mollicutes* on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. **Vet Microbiol**, v. 127, n. 3-4, p. 325-33, 2008.
- PILO, P.; FREY, J.; VILEI, E. M. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 513-21, 2007.
- PILO, P. et al. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. **J Bacteriol**, v. 187, n. 19, p. 6824-6831, 2005.
- PORTELA, V. et al. Caracterização preliminar do manejo nutricional de bovinos de leite no noroeste do rio grande do sul. **revista interdisciplinar de ensino, pesquisa e extensão**, v. 2, n. 1, 2015.
- RAE, D. O. et al. Reproductive performance of beef heifers: effects of vulvo-vaginitis, *Ureaplasma diversum* and prebreeding antibiotic administration. **Theriogenology**, v. 40, n. 3, p. 497-508, 1993.
- RAMIREZ, A. S. et al. A semi-defined medium without serum for small ruminant mycoplasmas. **Vet J**, v. 178, n. 1, p. 149-52, 2008.
- RAWADI, G. *Mycoplasma fermentans* interaction with monocytes/macrophages: molecular basis. **Microbes and infection**, v. 2, n. 8, p. 955-964, 2000.
- RAWADI, G. et al. Signal transduction pathways involved in the activation of NF- κ B, AP-1, and c-fos by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 4, p. 2193-2203, 1999.
- RAWADI, G.; ROMAN-ROMAN, S. *Mycoplasma* membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. **Infect Immun**, v. 64, n. 2, p. 637-643, 1996.
- RAZIN, S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). **Microbiological reviews**, v. 49, n. 4, p. 419, 1985.
- _____. Molecular properties of mollicutes: a synopsis. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**, v. 1, p. 1-25, 1995.
- RAZIN, S. The minimal cellular genome of mycoplasma. **Indian J Biochem Biophys**, v. 34, n. 1-2, p. 124-30, 1997.
- RAZIN, S. *Mycoplasma* Taxonomy and Ecology. In: Maniloff, J.; McElhaney, R. N.; Finch, L. R.; Baseman, J. B. **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, . p. 3- 22, 1992.
- RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-90, 2010.
- RAZIN, S.; JACOBS, E. *Mycoplasma* adhesion. **Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 407-422, 1992.

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

REZENDE, I. S. **Response of macrophages and bovine blastocysts after exposure to *Ureaplasma diversum***. [Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a *Ureaplasma diversum*]. 2016. X f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ROCK, F. L. et al. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 2, p. 588-593, 1998.

RÖSKE, K. et al. Phase Variation among Major Surface Antigens of *Mycoplasma penetrans*. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7642-7651, 2001.

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

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

ROTTEM, S. Invasion of mycoplasmas into and fusion with host cells. In: RAZIN, S. AND HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, p. 391-401, 2002.

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

SACHSE, K. et al. Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. **Zentralbl Bakteriell**, v. 284, n. 1, p. 80-92, 1996.

SACHSE, K. et al. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 680-7, 2000.

SANDERSON, M.; CHENOWETH, P. role of *Ureaplasma diversum* in bovine reproduction. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, 1999.

SCHMIDT, J. A.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, P. F. *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. **J Bacteriol**, v. 189, n. 9, p. 3414-24, 2007.

SCHMIDT, M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n. 1, p. 1, 2007.

SCHRÖDER, N. W. et al. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 4, p. 2683-2691, 2004.

SETO, S. et al. Visualization of the attachment organelle and cytodherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. **J Bacteriol**, v. 183, n. 5, p. 1621-30, 2001.

SHAW, J.; FALKOW, S. Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*. **Infect Immun**, v. 56, n. 6, p. 1625-1632, 1988.

SHIBATA, K.-I. et al. The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 11, p. 6538-6544, 2000.

SHIBATA, K.; SASAKI, T.; WATANABE, T. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. **Infect Immun**, v. 63, n. 10, p. 4174-7, 1995.

SHIMIZU, T.; KIDA, Y.; KUWANO, K. A dipalmitoylated lipoprotein from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF- κ B through TLR1, TLR2, and TLR6. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 7, p. 4641-4646, 2005.

SILVA, J. R. et al. Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF- α mediated womb inflammation in mice. **An Acad Bras Cienc**, v. 88, p. 643-652, 2016.

SIMMONS, W. L.; DYBVIG, K. The Vsa proteins modulate susceptibility of *Mycoplasma pulmonis* to complement killing, hemadsorption, and adherence to polystyrene. **Infect Immun**, v. 71, n. 10, p. 5733-5738, 2003.

SONG, Z. et al. alpha-Enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38836, 2012.

STOCK, L. et al. **Sistemas de produção e sua representatividade na produção de leite no Brasil**. 2008.

SUTCLIFFE, I. C.; RUSSELL, R. Lipoproteins of gram-positive bacteria. **J Bacteriol**, v. 177, n. 5, p. 1123, 1995.

TAVARES, I. K. et al. A relação da evolução das técnicas de criação e o advento das biotecnologias da reprodução com a incidência de distocias em bovinos. **INVESTIGAÇÃO**, v. 14, n. 1, 2015.

TAYLOR-ROBINSON, D.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 498-514, 2011.

TAYLOR-ROBINSON, D.; HAIG, D.; WILLIAMS, *Mycoplasma Bovine* t-strain mycoplasma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 143, n. 1, p. 517-518, 1967.

TU, A.-H. et al. Association of a major protein antigen of *Mycoplasma arthritidis* with virulence. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 245-249, 2005.

TUPY, O. et al. O potencial sustentável da bovinocultura de corte do Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 24, n. 4, p. 46-54, 2015.

VASCONCELOS, A. T. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **J Bacteriol**, v. 187, n. 16, p. 5568-77, 2005.

VILEI, E. M. et al. Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC. **Microbiology**, v. 146 (Pt 2), p. 477-86, 2000.

VILEI, E. M.; FREY, J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC: its impact on H₍₂₎ O₍₂₎ production and virulence. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 1, p. 85-92, 2001.

VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. Springer Science & Business Media, 2011. ISBN 0387684891.

WAITES, K. B.; CRABB, D. M.; DUFFY, L. B. Comparative in vitro susceptibilities and bactericidal activities of investigational fluoroquinolone ABT-492 and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 12, p. 3973-5, 2003.

WAITES, K. B.; TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 697-728, 2004.

WANG, Y. et al. *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 β production through the NF- κ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 111-118, 2016.

WESTBERG, J. et al. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). **Genome Res**, v. 14, n. 2, p. 221-227, 2004.

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

YAVLOVICH, A. et al. *Mycoplasma fermentans* binds to and invades HeLa cells: involvement of plasminogen and urokinase. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5004-11, Sep 2004.

YAVLOVICH, A.; TARSHIS, M.; ROTTEM, S. Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. **FEMS Microbiol Lett**, v. 233, n. 2, p. 241-6, Apr 15 2004.

YOGEV, D.; BROWNING, G. F.; WISE, K. S. Genetic mechanisms of surface variation. In: (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**: Springer, p.417-443. 2002.

YOU, X.-X.; ZENG, Y.-H.; WU, Y.-M. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 7, n. 5, p. 342-350, 2006.

ZHANG, Q.; WISE, K. S. Coupled phase-variable expression and epitope masking of selective surface lipoproteins increase surface phenotypic diversity in *Mycoplasma hominis*. **Infect Immun**, v. 69, n. 8, p. 5177-5181, 2001.

ZOU, X. et al. Molecular cloning and characterization of a surface-localized adhesion protein in *Mycoplasma bovis* Hubei-1 strain. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69644, 2013.

CAPÍTULO I

A resposta de macrófagos a *Ureaplasma diversum* e suas Lipoproteínas Associadas a Membrana é dependente da sinalização por TLR2 e TLR4

A resposta de macrófagos a *Ureaplasma diversum* e suas Lipoproteínas Associadas a Membrana é dependente da sinalização por TLR2 e TLR4

Manoel N. S. Junior^{1*}, Izadora S. Rezende², Clarissa L. S. Souza¹, Maysa S. Barbosa^{1,2}, Guilherme B. Campos^{1,2}, Éllunny C. Queiroz¹, Mariana M. Teixeira¹, Lucas S. C. Silva¹, Flávia de S. Nascimento¹, Beatriz A. Sampaio¹, Letícia O. Silva¹, Tássyo L. Silva¹, Ana M. S. Guimarães², Bruno L. Bastos¹, Jorge Timenetsky², Lucas M. Marques^{1,2,3*}

1 Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil

2 Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

3 Universidade de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ihéus, Brasil

* E-mail: neres.manoel@hotmail.com; lucasm@ufba.com

Resumo

Ureaplasma diversum é um agente patogênico oportunista que causa grave inflamação no trato reprodutivo das vacas, interferindo na reprodução bovina. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* em cultura de macrófagos bovinos. Para isto, as cepas ATCC 49782 e IC-GOTA viáveis e inativadas pelo calor bem como suas respectivas lipoproteínas isoladas foram inoculadas em culturas de macrófagos na presença ou ausência de bloqueadores de sinalização do receptor tipo Toll (TLR) 2, TLR2 / 4 e do fator nuclear kappa B (NF-κB). A concentração de óxido nítrico (NO) foi medida a partir do sobrenadante da cultura e as células foram processadas para o ensaio qPCR e a análise da expressão gênica da interleucina 1 beta (IL-1β), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), TLR2 e TLR4. As cepas ATCC 49782 e IC-GOTA (Incubação durante 6, 12 e 24 horas) e diferentes concentrações de lipoproteínas (Incubação durante 2, 6 e 12 horas) induziram maior expressão gênica em relação a culturas não infectadas. Houve também indução de secreção de NO, mostrando que esta substância pode estar envolvida na patogênese dessas bactérias. A inoculação de *U. diversum* em macrófagos bovinos na presença de bloqueadores inibiu a expressão de IL-1β e TNF-α em todos os tratamentos. Esses dados dão fortes indícios de que

U. diversum e suas lipoproteínas isoladas estimulam a produção de NO e interagem com TLR4 em um tipo de sinalização envolvendo TLR2, essa interação ativa NF- κ B que por sua vez atua estimulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Até a presente data não foram encontrados trabalhos avaliando a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* em cultura de macrófagos bovinos. Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão da atividade imunomoduladora e da patogenicidade destes agentes infecciosos.

Palavras-chave: *Ureaplasma diversum*; macrófagos; NF- κ B; TLR.

Introdução

U. diversum pertencente ao gênero *Ureaplasma* e é conhecido por causar infecções no trato respiratório e genital bovino [1-3]. Este micro-organismo pode estar associado em patologias como vulvite granular, endometrite, alveolite fetal, infertilidade e aborto em fêmeas. Em machos *U. diversum* pode infectar, invadir e promover alterações morfológicas em espermatozoides [4,5]. Além disso, a sua capacidade de invasão celular [4-6], associada à modulação dos mecanismos de indução e inibição de apoptose podem estar relacionados com a persistência deste micro-organismo no ambiente intracelular e na proteção contra a ação dos antimicrobianos e dos fatores imunitários do hospedeiro [7].

U. diversum apresenta genoma de tamanho reduzido, com cerca de 975,425 pbs [8]. O pequeno genoma, assim como em outro *Mollicutes*, tem como consequência a ausência de genes não essenciais, incluindo genes de síntese de parede celular, catabolismo e passos metabólicos [8-10]. Isso explica o complexo requerimento nutricional, fazendo com que vários nutrientes e precursores biossintéticos sejam extraídos do hospedeiro [8-12]. A espoliação de nutrientes associado à produção de amônia pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) consiste em importantes fatores de virulência dos ureaplasmas [8-14].

De modo geral, *Mollicutes* possuem grande quantidade e diversidade de lipoproteínas associadas à membrana (LAMPs). As LAMPs são consideradas os principais padrões moleculares associados a patógeno [15-17] e podem ser extraídas por meio de Triton X-114 devido à sua característica hidrofóbica [18]. Essas lipoproteínas desempenham papel importante na infecção e na lesão de órgãos e estão envolvidas na ativação ou inibição da apoptose [19], na funcionalidade do transportador ABC [20], na virulência de diferentes cepas [21,22] e na adesão celular [23,24].

Para vários *Mollicutes* a produção de citocinas pró-inflamatórias está associada a interações de LAMPs com TLR [16]. Os TLRs são os receptores de superfície celular de macrófagos, monócitos e células dendríticas envolvidas no reconhecimento destas

lipoproteínas . O padrão de sinalização difere para as diversas espécies de mollicutes, sendo que diferentes TLRs podem estar envolvidos no processo de sinalização [16, 25, 26]. De modo geral *Mollicutes* e/ou LAMPs interagem com algum TLR levando ao recrutamento intracelular de fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) que culmina na ativação de NF- κ B e proteína ativadora 1 (AP-1) [16, 27]. Estes fatores de transcrição desempenham papel central na indução de citocinas pró-inflamatórias [28, 29]. O gene da IL-1 β , regulada pela via de sinalização NF- κ B, é um importante gene associado à inflamação que é regulado positivamente durante muitos tipos de infecção patogênica [32-34].

Até a presente data não foram encontrados em bancos de dados trabalhos avaliando a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* em cultura de macrófagos bovinos. No entanto, o sequenciamento recente do genoma desta bactéria revelou a presença de vários genes relacionados a LAMPs, incluindo genes responsáveis pela codificação de proteínas variáveis de superfície (VSPs), isso indica um possível papel de LAMPs na patogenia causada por *U. diversum* [8, 10]. Com base nestas evidências o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do TLR2, TLR4 e NF- κ B na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e a produção de NO.

Material e métodos

Cultivo e inativação de *U. diversum*

A cepa padrão de *U. diversum* ATCC 49782, originalmente isolada de uma vaca com vulvovaginite granular em Ontário (províncias do Canadá) [35] e a cepa IC-GOTA, obtida a partir de muco vulvo-vaginal de uma vaca em São Paulo (Brasil), Foram primeiramente cultivadas em 1 mL de meio *Ureaplasma* (UB) [35] a 37°C, seguido de expansão para 200 mL volumes do mesmo caldo. A confirmação da espécie foi realizada por PCR espécie-

específica usando os iniciadores UD3 e UD4 [36]. Na fase de crescimento logarítmico (com base nas alterações colorimétricas), a cultura foi centrifugada a 14000 rpm durante 25 minutos a 20°C. O sedimento foi homogeneizado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) [37] e parte desse inóculo foi quantificado em microplacas de 96 poços e incubado por 24 horas para determinação da Unidade de Mudança Colorimétrica (CCU/mL) [38]. Foram determinados CCUs de 10^6 , 10^5 e 10^4 *Ureaplasma*/mL para ATCC 49782 e 10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL para IC-GOTA. Outra parte do inóculo (referente ao maior CCU/mL de cada cepa) foi destinada à inativação por calor em banho-maria a 100 ° C por 30 minutos.

Extração e quantificação de proteínas de membrana associadas a lipoproteínas de *U. diversum* (LAMPsUd)

A preparação de LAMPsUd seguiu a metodologia previamente descrita [27]. Resumidamente, 200 mL de ureaplasma foram centrifugados a 1500 rpm durante 30 minutos a 4°C; O sedimento foi lavado 2 vezes em PBS intercalado por centrifugação (1500 rpm durante 15 minutos a 4°C). Após lavagem, o sedimento foi suspenso em 5 mL de Tris-EDTA seguido pela adição de Triton TX-114 até uma concentração final de 2%. A mistura foi incubada a 48°C durante 60 minutos para formar o lisado de Triton TX-114. O lisado foi incubado a 37°C durante 10 minutos para separação de fases. A fase aquosa superior foi removida e a fase orgânica foi completada para o volume de 1 mL por adição de Tris-EDTA seguido por adição de 2,5 mL de etanol gelado e incubação overnight (-20°C) para precipitação dos LAMPsUd. O material precipitado foi centrifugado a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C e o excesso de álcool foi evaporado restando as lipoproteínas. As LAMPsUd foram suspensas em PBS e quantificadas pelo ensaio fluorimétrico em equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para o fracionamento de proteínas, utilizou-se eletroforese em gel de acrilamida contendo sulfato de dodecil de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a técnica descrita por Laemmli [39]. Após fracionamento, o gel foi corado com solução de azul de coomassie durante 30 minutos a 50°C sob agitação constante. A solução corante foi então removida e a solução descorante foi adicionada (500 mL de metanol, 200 mL de ácido acético e água purificada suficiente para 1300 mL). O gel permaneceu no descorante até que as frações proteínas apresentarem-se nítidas. Como referência, foi utilizada uma solução com o marcador de peso molecular de Protein Novex.

Coleta de sangue e isolamento de macrófagos bovinos

A coleta de sangue periférico obedeceu às disposições éticas para a pesquisa animal. O Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Multidisciplinar de Saúde - Universidade Federal da Bahia aprovou o estudo. As amostras foram coletadas em tubos de vacutainer EDTA e imediatamente processadas [40]. Para isolamento de polimorfos mononucleares o sangue periférico foi diluído 1:1 com PBS; (PH 7,4) e 10 mL da diluição foram adicionados sobre 3 mL de Ficoll-Histopaque (densidade: 10771) formando a barreira Ficoll-Histopaque. O material foi centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente durante 20 minutos e as células mononucleares presentes na interface Ficoll/plasma foram lavadas em PBS duas vezes Intercaladas por centrifugação (1250 rpm durante 10 minutos). Para o isolamento de monócitos, as células mononucleares foram suspensas em solução A (5 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal) e esta solução foi adicionada lentamente a 5 mL de solução B (5 mL de meio RPMI 1640 + 4,75 mL de Percoll + 0,322 mL de PBS). Esta mistura foi centrifugada durante 30 minutos, 1500 rpm, 20°C. Os monócitos presentes na interface formada entre as soluções foram coletados e o sedimento contendo os linfócitos foi descartado

[41]. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, a viabilidade celular foi avaliada com 0,1% de Azul de Tripán (viabilidade > 90%). Após a contagem, a concentração de células viáveis foi ajustada para 4×10^5 células/mL por adição de meio RPMI 1640 suplementado (contendo 10% de bovino fetal e 100 U/mL de penicilina no soro) e cultivadas no mesmo meio. Após 6 horas, as culturas foram lavadas com meio de cultura e somente após 24 horas de isolamento, as células foram utilizadas. A diferenciação de monócitos em macrófagos aderentes foi confirmada por microscopia [40, 42].

Inoculação de *U. diversum* e LAMPsUd em macrófagos bovinos

Macrófagos bovinos (4×10^5 células/mL) foram inoculados com a cepa ATCC 49782 (10^6 , 10^5 e 10^4 *Ureaplasma*/mL) e cepa IC-GOTA (10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL). Também foram utilizadas cepas inativadas de ATCC 49782 (inativado a partir de CCU 10^6 *Ureaplasma*/ml) e IC-GOTA (inativado a partir de CCU 10^5 *Ureaplasma*/mL). Ambos os tratamentos foram incubados por tempos de 6, 12 e 24 horas. Para tratamento com lipoproteínas, os macrófagos foram incubados com LAMPsUd de ambas as cepas em concentrações de 2,0, 1,5, 1,0 e 0,5 µg/mL nos tempos de 2, 6 e 12 horas. Como controle negativo, os macrófagos foram inoculados com PBS. O controle positivo consistiu na inoculação de 100 µg/mL de lipopolissacarídeos (LPS) em culturas. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi destinado à dosagem de NO e as células foram recolhidas, suspensas em RNeasy lysis reagent TM e congeladas a -70 °C para subsequente extração de RNAm.

Bloqueadores de sinalização

Macrófagos bovinos (4×10^5 células/mL) foram incubados com a cepa ATCC 49782 (10^5 *Ureaplasma*/mL) e IC-GOTA (10^3 *Ureaplasma*/mL) e LAMPsUd (2,0 µg/ml) de ambas as cepas na presença de bloqueadores de sinalização [43]. Os receptores TLR-2/4 (OxPAPC),

TLR-4 (CLI-095) e NF- κ B (Celastrol) foram adquiridos a Invivogen (Invivogen, San Diego, CA) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Para controle negativo, as células foram co-incubadas com PBS. O controle positivo consistiu em inocular as cepas ou LAMPsUd em cultura na ausência de bloqueadores.

Extração de RNAm, síntese de DNAc e expressão gênica

O RNAm das células foi extraído utilizando o kit de purificação de ARN Trizol Plus (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O RNAm foi submetido a retrotranscrição (RT) para obtenção do DNA complementar (DNAc) utilizando o kit SuperScript[®] III Reverse Transcriptase. O DNAc foi utilizado numa reação qPCR para determinar a expressão gênica de IL-1 β , TNF- α , TLR2 e TLR4. O RT-qPCR foi executado três tempos independentes com pelo menos três amostras por grupo. A análise dos dados relativos expressão gênica foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [44]. O GAPDH serviu como controle interno da reação para avaliar o conteúdo global de DNAc.

Dosagem de óxido nítrico

Para a dosagem do NO, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO²⁻). Adicionou-se a uma microplaca 50 μ l do sobrenadante de culturas, seguido do mesmo volume do reagente de Griess (composto 1:1 sulfanilamida 1% diluída em H₃PO₄ 2,5% e de N-1-naphtylethylenodiamina, também diluído em solução de H₃PO₄ a 2,5%). Na mesma placa, para confecção da curva padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μ M passou por diluições seriadas (fator 2) em água destilada. Após incubação da placa por de 10 minutos, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 540 nm. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão de NaNO₂

cujos valores utilizados para cálculo foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M. [45].

Análise estatística

As comparações foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad-Prism (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas valores com p iguais ou inferiores a 0,05, utilizando intervalo de confiança de 95%.

Resultados

***U. diversum* induz a expressão de IL-1 β , TNF- α , TLR2 e TLR4 em macrófagos bovinos**

A avaliação da expressão gênica em macrófagos bovinos induzida por *U. diversum* viável e inativada mostrou que nos tempos de 6 e 12 horas as cepas ATCC 49782 e IC-GOTA induziam maior expressão de IL-1 β (Fig. 1A e 1B), TNF- α (Fig. 1C e 1D), TLR2 (Fig. 1E e 1F) e TLR4 (Fig. 1G e 1H) em ambas as condições quando comparado com o controle negativo ($p < 0,05$). Nestes tempos, a condição viável das duas cepas estimulou maior expressão gênica quando comparada com a cepa inativada em todos os genes estudados ($p < 0,05$). A inoculação por 24 horas não estimulou a expressão gênica estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, com baixa expressão nas condições viáveis e inativas inclusive para o controle positivo (LPS).

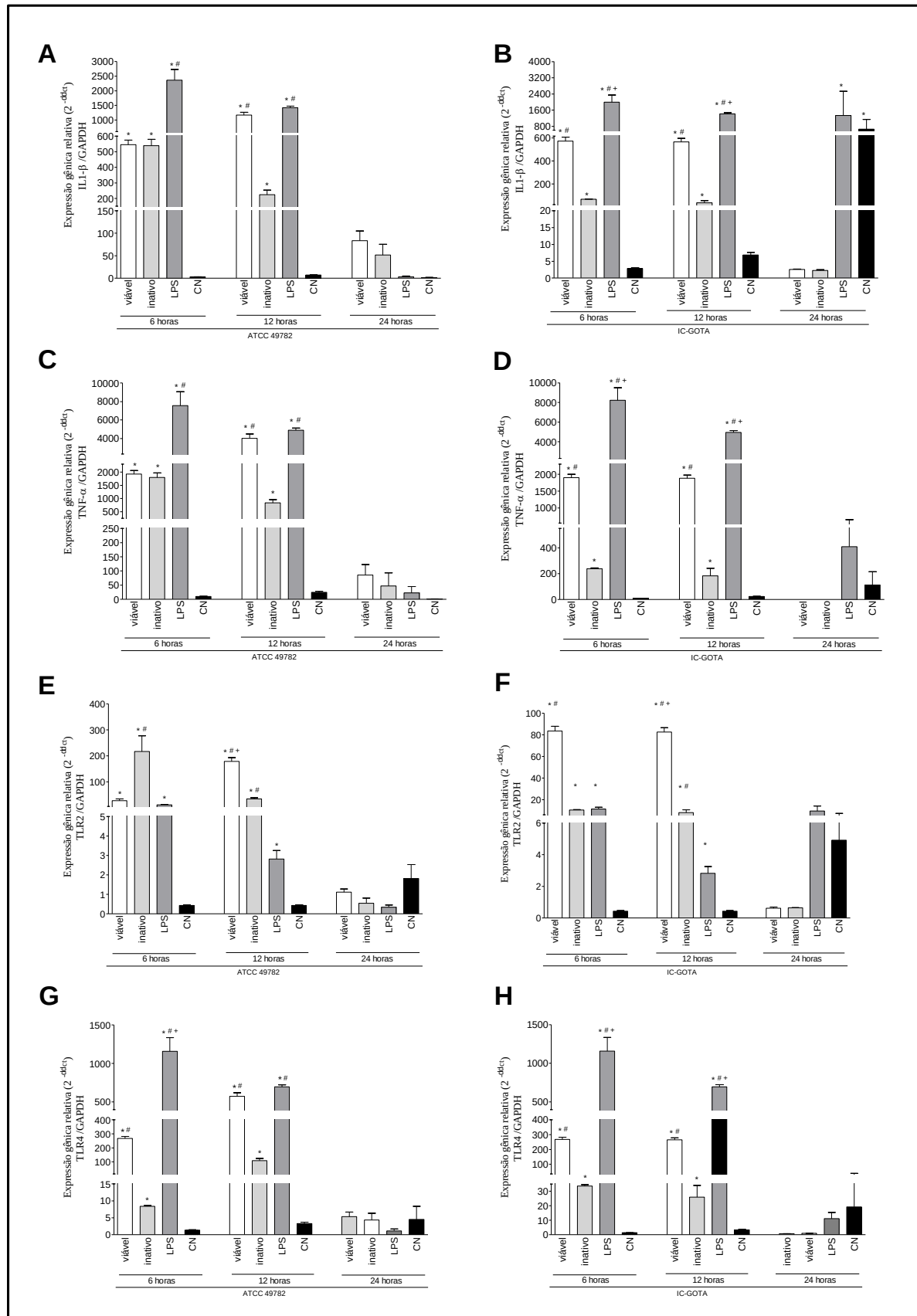


Fig. 1. Expressão gênica relativa em macrófagos bovinos infectados com *U. diversum* (cepas ATCC 49782 e IC-GOTA) durante 6, 12 e 24 horas com cepas viáveis e inativas. (A) Expressão de IL-1β induzida pela cepa

ATCC 49782. (B) Expressão de IL-1 β induzida pela cepa IC-GOTA. (C) Expressão de TNF- α induzida pela cepa ATCC 49782. (D) Expressão de TNF- α induzida pela cepa IC-GOTA. (E) Expressão de TLR2 induzida pela cepa ATCC 49782. (F) Expressão de TLR2 induzida pela cepa IC-GOTA. (G) Expressão de TLR4 induzida pela cepa ATCC 49782. (H) Expressão de TLR4 induzida pela cepa IC-GOTA. Os tratamentos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn usando o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se PBS como controle negativo (CN) e 100 U/mL de LPS como controle positivo. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos (*, #, + e &). Consideram-se grupos estatisticamente diferentes os que possuem símbolos diferentes.

Cargas bacterianas maiores induziram maior expressão dos genes estudados. As cargas 10^6 , 10^5 e 10^4 *Ureaplasma*/mL da cepa ATCC 49782 e 10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL de cepa IC-GOTA induziram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da expressão de IL-1 β (Fig. 2A e 2B), TNF- α (Fig. 2C e 2D), TLR2 (Fig. 2E e 2F) e TLR4 (Fig. 2G e 2H) em relação ao controle negativo nos tempos de 6 e 12 horas de incubação. Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes CCUs em ambas as cepas e em todos os genes estudados. Em 24 horas foi observada diferença estatística apenas para a expressão de IL-1 β induzida pela cepa ATCC 49782 no CCU 10^6 *Ureaplasma*/mL (FIG 2A) e para IC-GOTA nos CCUs 10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL (FIG 2B) quando comparada com o controle negativo ($p < 0,05$). No entanto, em 24 horas ocorreu baixa expressão em todos os genes quando comparada aos tempos de 6 e 12 horas, além disso, neste tempo de incubação o LPS não induziu expressão genética significativa em comparação ao controle negativo.

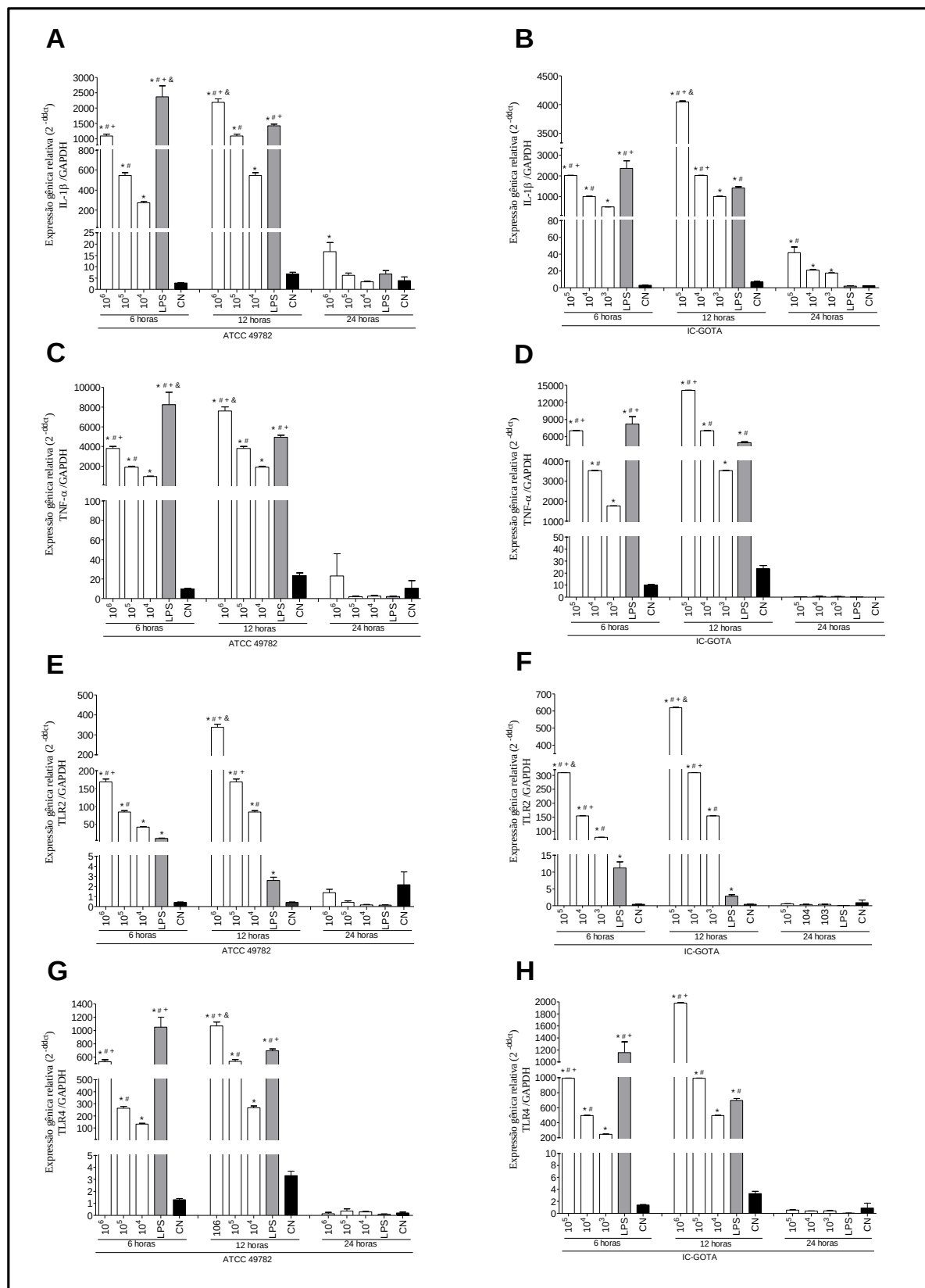


Fig. 2. Expressão gênica relativa em macrófagos bovinos infectados com *U. diversum* (cepas ATCC 49782 e IC-GOTA) durante 6, 12 e 24 horas em diferentes CCUs (*Ureaplasma*/mL). (A) Expressão de IL-1β em macrófagos inoculados com a cepa ATCC 49782. (B) Expressão de IL-1β em macrófagos inoculados com a cepa

IC-GOTA. (C) expressão de TNF- α em macrófagos inoculados com cepas ATCC 49782. (D) Expressão de TNF- α em macrófagos inoculados com a cepa IC-GOTA. (E) Expressão de TLR2 em macrófagos inoculados com cepas ATCC 49782. (F) Expressão de TLR2 em macrófagos inoculados com a cepa IC-GOTA. (G) Expressão de TLR4 em macrófagos inoculados com cepas ATCC 49782. (G) Expressão de TRL4 em macrófagos inoculados com a cepa IC-GOTA. Os tratamentos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn usando o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se PBS como controlo negativo (CN) e 100 U/mL de LPS como controle positivo. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos (*, #, + e &); Consideram-se grupos estatisticamente diferentes com símbolos diferentes.

LAMPsUd das cepas ATCC 49782 e IC-GOTA têm um padrão de banda semelhante

Na eletroforese em SDS-PAGE, foi possível verificar que os LAMPsUd de ATCC 49782 e IC-GOTA apresentaram padrões de banda bastante similares. As duas cepas estudadas têm um maior número de LAMPsUd variando de 50 a 80 KDa. (Fig. 3).

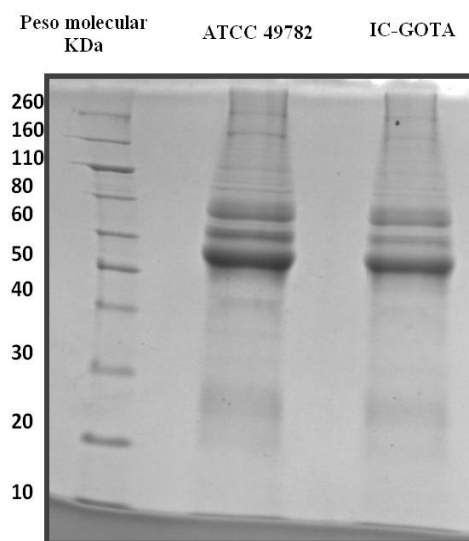


Fig. 3. Gel obtido a partir da eletroforese SDS-PAGE dos LAMPsUd. Primeira coluna: separação do peso molecular da Proteína Novex. Segunda coluna: separação de LAMPsUd de ATCC 49782. Terceira coluna: separação de LAMPsUd de IC-GOTA.

LAMPsUd induzem expressão de genes relacionados à resposta pró-inflamatória

As LAMPsUd da cepa ATCC 49782 e IC-GOTA também induziram expressão estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$) para todos os genes estudados e em todas as concentrações testadas (2,0, 1,5, 1,0 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) após 2 e 6 horas de incubação (Fig. 4A - H). Em geral, a expressão máxima em todas as concentrações

testadas ocorreu após 2 horas (dos tempos avaliados) de incubação com ambas as cepas. A concentração de 1,5 µg/mL induziu a expressão gênica mais elevada nos tempos avaliados. Como ocorreu nas análises das condições viáveis e inativas (Fig. 1) e diferentes CCUs (Fig. 2) no tempo de 24 horas houve baixa expressão gênica, sendo estatisticamente diferente do controle negativo apenas a expressão de IL-1 β nas concentrações de 2,0 e 1,5 µg/mL da cepa IC-GOTA ($p < 0,5$).

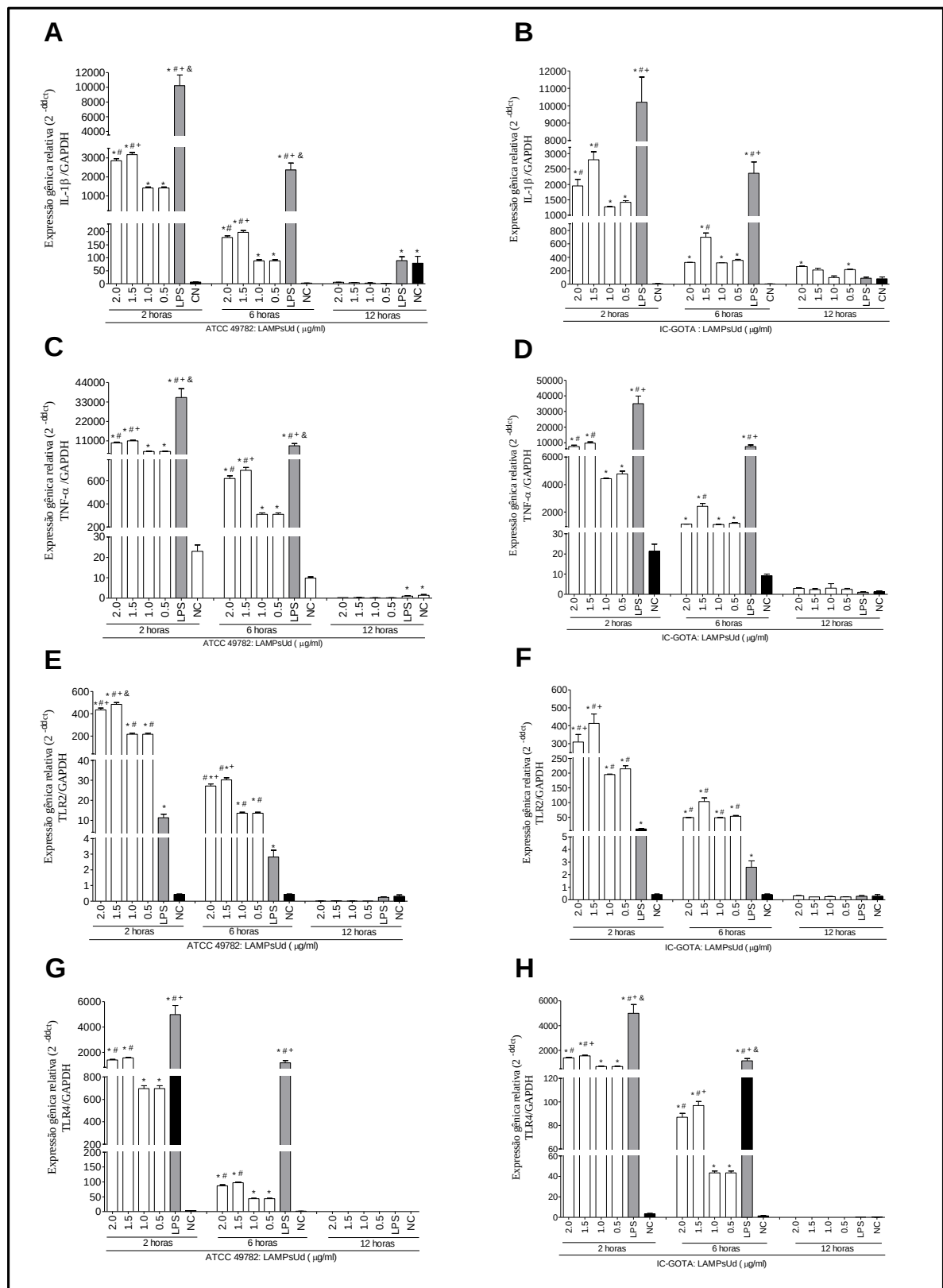


Fig. 4. Expressão gênica em macrófagos bovinos induzida por diferentes concentrações de LAMPsUd após 2, 6 e 12 horas de inoculação. (A) Expressão gênica de IL-1β após incubação com LAMPsUd da cepa ATCC 49782. (B) Expressão gênica de IL-1β após incubação com LAMPsUd da cepa IC-GOTA. (C) Expressão gênica de TNF-α após incubação com LAMPsUd da cepa ATCC 49782. (D) Expressão gênica de TNF-α após

incubação com LAMPsUd da cepa IC-GOTA. (E) Expressão gênica de TLR2 após incubação com LAMPsUd da cepa ATCC 49782. (F) Expressão gênica de TLR2 após incubação com LAMPsUd da cepa IC-GOTA. (G) Expressão gênica de TLR4 após incubação com LAMPsUd da cepa ATCC 49782. (H) expressão gênica de TLR4 após incubação com LAMPsUd da cepa IC-GOTA. Os tratamentos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn usando o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se PBS como controle negativo (CN) e 100 U/mL de LPS foi usado como controle positivo. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos (*, #, + e &). Consideram-se grupos estatisticamente diferentes que apresentam diferentes símbolos.

***U. diversum* e LAMPsUd induzem maior produção de NO por macrófagos bovinos**

O sobrenadante de cultura de macrófagos tratado com cepa ATCC 49782 apresentou maior concentração de NO em comparação com o controle ($p < 0,05$) quando tratado com cepas viáveis e inativas (Fig. 5A). Apenas a cepa viável de IC-GOTA estimulou a produção de NO estatisticamente diferente (Fig. 5B). Todas as cargas bacterianas da cepa ATCC 49782 (10^6 , 10^5 e 10^4 *Ureaplasma*/mL) e a cepa IC-GOTA (10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL) estimularam maior produção de NO ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo (Fig. 5C E 5D). A produção de NO em macrófagos bovinos estimulados pela CCU 10^5 *Ureaplasma*/mL da cepa IC-GOTA foi estatisticamente superior as cargas bacterianas 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL ($p < 0,05$). Na cepa ATCC 49782, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Todas as concentrações de LAMPsUd testadas, das cepas ATCC 49872 e IC-GOTA, foram capazes de estimular maior produção de NO quando comparado ao controle negativo, porém, não houve diferença estatística entre as concentrações avaliadas (Fig. 5E e 5F). Até mesmo a cepa inativada (tempos de 1 a 36 horas), as cargas bacterianas mais baixas utilizadas (tempos de 3 a 24 horas) e as menores concentrações de LAMPsUd (tempos de 0 a 12 horas) foram capazes de induzir a produção de NO em macrófagos bovinos (Material Suplementar 1. fig. 7 – e Material Suplementar 2. fig. 8).

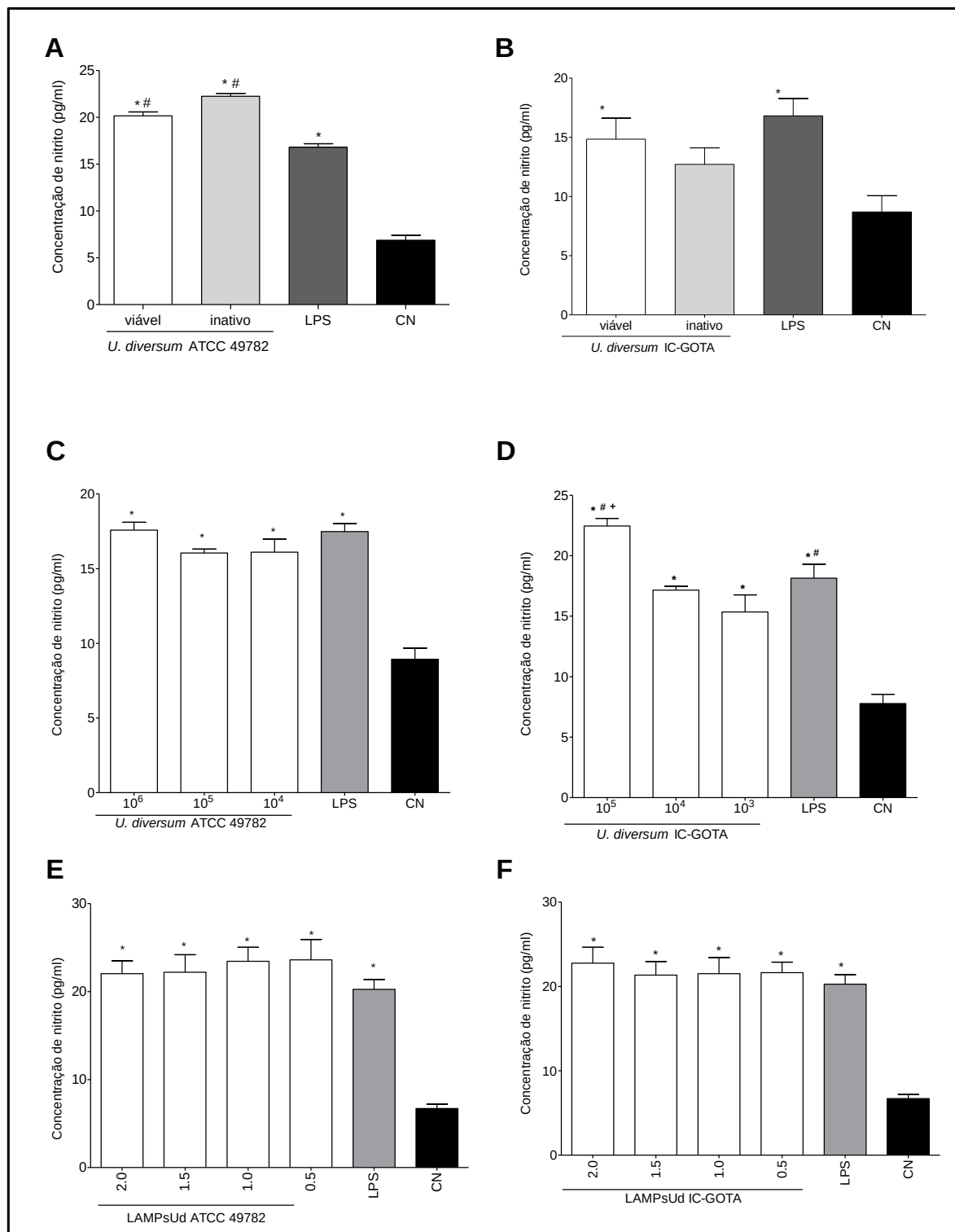


Fig. 5. Concentração indireta de NO pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos infectados com cepas de *U. diversum* e LAMPsUd após 24 horas de inoculação. (A) Cepas viáveis e inativas ATCC 49782. (B) Cepas viáveis e inativas de IC-GOTA. (C) Cepa ATCC 49782 nos CCUs 10^6 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL. (D) Cepa IC-GOTA nos CCUs 10^5 , 10^4 e 10^3 *Ureaplasma*/mL. (E) Diferentes concentrações de LAMPsUd da cepa ATCC 49782. (F) Diferentes concentrações de LAMPsUd da cepa IC-GOTA. Os tratamentos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-

teste de Dunn utilizando o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se PBS como controle negativo (CN) e 100 U/mL de LPS como controle positivo. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos (*, #, + e &); Consideram-se grupos estatisticamente diferentes que apresentam diferentes símbolos.

O bloqueio de TLR4, TLR2 ou NF- κ B inibe a expressão de IL-1 β e TNF- α em macrófagos bovinos

A utilização de bloqueadores de sinalização TLR4 (CLI-095), TLR2 / 4 (OxPAPC) e NF- κ B (Celastrol) reduziu significativamente a expressão de IL-1 β e TNF- α em macrófagos infectados com ATCC 49782 e IC-GOTA (Fig. 6A e 6C), bem como em culturas tratadas com LAMPsUd de ambas as cepas (Fig. 6B e 6D) em comparação com o tratamento sem bloqueador ($P < 0,05$). O controle positivo (S/B: sem bloqueadores) também foi estatisticamente diferente do controle negativo (CN: macrófagos tratados com PBS).

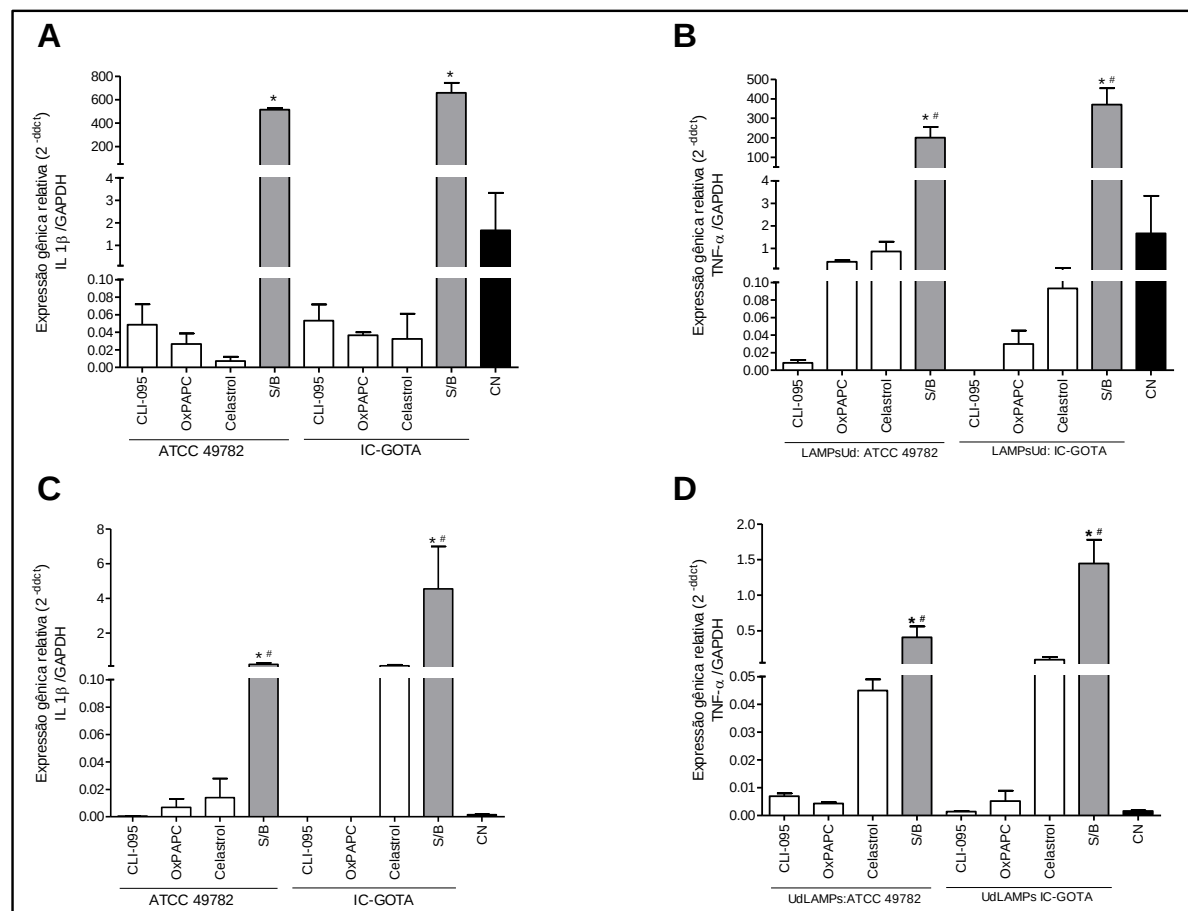


Fig. 6. Expressão gênica relativa de IL-1 β e TNF- α na cultura de macrófagos bovinos tratados com *U. diversum* e LAMPsUd na presença de bloqueadores de sinalização para TLR4 (CLI-095), TLR2/4 (OxPAPC) e NF- κ B (Celastrol). (A) Expressão de IL-1 β após incubação com ATCC 49782 (10^5

Ureaplasma/mL) e IC-GOTA (10^3 *Ureaplasma*/mL). (B) Expressão de TNF- α após incubação com ATCC 49782 (10^5) e IC-GOTA (10^3 *Ureaplasma*/mL). (C) Expressão de IL-1 β após incubação com LAMPsUd de ATCC 49782 e IC-GOTA (2 μ g / ml). (D) Expressão de TNF- α após incubação com LAMPsUd e ATCC 49782 e IC-GOTA (2 μ g/mL). Os tratamentos foram comparados com controle positivo (inoculação de *U. diversum* ou LAMPsUd na ausência de bloqueador: S/B). Utilizou-se PBS como controle negativo (CN). Os tratamentos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn utilizando o software GraphPad Prism® versão 6.01. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos (*, #, + e &). Consideram-se grupos estatisticamente diferentes que apresentam diferentes símbolos.

Discussão

A patogenicidade de *U. diversum* não é bem compreendida, mas é provável que envolva a ativação de macrófagos através da interação com TLRs, como ocorre para outros *Mollicute* [16, 43, 46]. *U. diversum* está associado a uma série de distúrbios reprodutivos em bovinos que culminam com uma inflamação grave relacionada à capacidade de invasão celular e modulação dos mecanismos de apoptose [1,4-7,47-49]. Para outros *Mollicutes* a estimulação que leva a estes eventos está estritamente relacionada à interação dessas bactérias com receptores da célula hospedeira [16,19-24].

No presente estudo, *U. diversum* viável e inativo (cepas ATCC 49782 e IC-GOTA) foi capaz de regular a expressão de IL-1 β , TNF- α , TLR2 e TLR4 em macrófagos bovinos quando comparado com o grupo não infectado nos tempos de 6 e 12 horas de incubação. Para a maioria dos tratamentos a cepa viável estimulou maior expressão quando comparada com a cepa inativada. A expressão do perfil gênico pró-inflamatório, em parte, explica a inflamação grave, descrita em outros estudos, no trato reprodutivo de vacas infectadas [2, 4, 36,48-50]. Estudos em macrófagos murinos mostraram que a inoculação de *U. diversum* viável ou inativado causa aumento da expressão de TLR2 associada ao aumento da produção de IL-1 β e TNF- α [10]. *Mycoplasma bovis* viável ou inativado também foi capaz de estimular em ambas às condições a expressão de IL-1 β em células de pulmão de embrião bovino e, da mesma forma que no presente estudo, a cepa viável estimulou maior expressão [16]. Trabalhos anteriores mostraram que a IL-1 β e TNF- α têm expressão aumentada em células

mononucleares humanas infectadas com *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma orale* e *Mycoplasma gallisepticum* [36, 43,51].

Para verificar se a carga de *U. diversum* interfere na expressão de genes pró-inflamatórios, foram inoculadas diferentes concentrações bacterianas em cultura de macrófagos. A estimulação da resposta foi dependente da dose, uma vez que inóculos mais concentrado desencadeou maior expressão em relação a concentrações mais baixas. Em estudos realizados por Silva et al. [52] A infecção por *U. diversum* em um modelo de infecção intrauterina de rato induziu a produção de TNF- α quando foi utilizado concentrações de 10^6 e 10^8 *Ureaplasma*/mL, no entanto, a concentração de 10^4 *Ureaplasma*/mL não causou expressão considerável [52]. No presente estudo, *U. diversum* induziu expressão significativa desta citocina em macrófagos bovinos estimulados com 10^4 *Ureaplasma*/mL em ambas as cepas avaliadas (ATCC 49782 e IC-GOTA) quando comparadas com culturas não expostas a infecção. Do mesmo modo, *U. diversum* também foi capaz de induzir a produção de TNF- α em macrófagos murinos em um modelo dose dependente [53]. Assim, como sugerido por Marques et al. [54], maiores cargas bacteriana de *U. diversum* pode estar diretamente relacionada a condições clínicas mais graves em vacas infectadas.

Em nossos resultados, as LAMPsUd das cepas ATCC 49782 e IC-GOTA estimularam a expressão de IL-1 β , TNF- α , TLR2 e TLR4 em tempos de 6 e 12 horas de incubação. A concentração de 1,5 μ g/mL foi a que induziu maior expressão, indicando que a expressão máxima do gene é estimulada por esta concentração. Desta forma, estas lipoproteínas têm uma participação considerável na expressão do perfil pró-inflamatório gerado na cultura de macrófagos. De acordo com Chambaud [15] e You [55], as LAMPs são consideradas os principais fatores de virulência para *Mollicutes* e desempenham papel central no estabelecimento da resposta inflamatória. Também já foi verificado que LAMPs de *M.*

genitalium podem estimular a produção de TNF- α e IL-1 β em monócitos humanos [56]. Este é o primeiro relato relacionado à resposta inflamatória à LAMPsUd, portanto, serão necessários mais estudos para maior compreensão do papel das lipoproteínas na imunopatogênese de *U. diversum*. A incubação de macrófagos por 24 horas foi marcada por baixa expressão gênica quando incubada com cepas viáveis e inativas, diferentes CCUs e diferentes concentrações de LAMPs. O tempo de exposição prolongado provavelmente gerou efeitos citotóxicos nos macrófagos bovinos.

A produção de NO também foi avaliada no presente estudo. *U. diversum* foi capaz de induzir aumento na produção de NO em macrófagos cultivados em todos os tratamentos avaliados. A produção de NO pode contribuir para a patogenicidade de *U. diversum* uma vez que esta molécula está envolvida em uma variedade de fatores fisiológicos. O excesso de produção de NO pode desencadear a apoptose em vários tipos de células. Muitas espécies de micoplasmas causam apoptose induzida pelo excesso de NO [57,58]. O efeito do NO ainda não foi avaliado na indução da apoptose por *U. diversum*, no entanto, Amorim et al. [7] demonstraram que essas bactérias causam apoptose em células Hep-2 no estágio inicial da infecção. No presente estudo, concentrações consideráveis de NO foram observadas precocemente após infecção por *U. diversum* e LAMPsUd (S1. Fig. 7 e S2. Fig 8) indicando que a produção de NO pode estar relacionada à indução da apoptose, no entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar a correlação da produção de NO e apoptose gerada por *U. diversum*.

A indução da expressão de IL-1 β e TNF- α é algo comumente descrito na resposta gerada contra molicutes. Vários estudos descreveram o envolvimento dessas citocinas tanto *in vivo* [16, 59] como *in vitro* [60, 61]. No presente estudo, além da expressão de IL- β e TNF- α , a expressão de TLR2 e TLR4 também foi aumentada. Para verificar o envolvimento destes receptores durante a infecção foram utilizados inibidores específicos de sinalização por TLR2,

TLR2/4 e NF- κ B. O bloqueio da sinalização por estes receptores induziu redução significativa na expressão de IL- β e TNF- α . Outros estudos mostraram a importância do NF- κ B na mediação da resposta pró-inflamatória em infecções por *Mollicute*. A produção de TNF- α , IL-1 β em células de linhagem monocítica humana (THP-1) infectadas com *Mycoplasma genitalium* envolve modulação por NF- κ B ou AP-1 [62]. LAMPs derivados de *M. genitalium* também pode ativar NF- κ B através TLR1, TLR2 e TLR6 [27], o mesmo ocorre em células THP-1 infectadas com *M. pneumoniae* [51], e em macrófagos infectados com LAMPs de *Ureaplasma parvum* [63]. Wang et al. (2016) mostraram que a superexpressão de TLR2 e MyD88 em células de pulmão de embrião bovino depende da estimulação por LAMPs de *M. bovis* e que essas lipoproteínas ativam a produção de IL-1 β através da sinalização por NF- κ B por uma via dependente de TLR2 e MyD88 [16]. Como pode ser observado a sinalização para muitos *Mollicutes* envolve geralmente TLR1, TLR2 e TLR6. TLR2 e TLR6 podem discriminar diferentes componentes microbianas, incluindo LAMPs de mollicutes [64-66]. No entanto, estudos realizados por Marques et al. [10] mostraram baixa expressão de TLR6 em macrófagos murinos infectados com *U. diversum*. Os resultados do presente estudo indicam que a expressão de IL-1 β e TNF- α em macrófagos infectados com *U. diversum* e LAMPsUd não seguiu este padrão de sinalização, uma vez que o bloqueio TLR4 também inibiu a expressão destas citocinas. Os dados do presente trabalho sugerem que um modelo de sinalização induzido por *U. diversum* em macrófagos bovinos deve envolver uma interação entre TLR4 e TLR2. A sinalização por TLR4 é pouco descrito para *Mollicutes*, no entanto, este tipo de interação foi verificado em *M. arthritidis*, onde TLR2 e TLR4 induzem o aumentando da ligação e apresentação dos antígenos desta bactéria para as células T [26]. Além disso, a caracterização da atividade estimulatória de LAMPs de *Ureaplasma urealyticum* demonstrou que estas bactérias interagem com TLR2 e TLR4 levando ao desenvolvimento de resposta inflamatória [25]. Estudos realizados por Shimizu et al. [67]

mostraram que *M. pneumoniae* induz fortes respostas inflamatórias em macrófagos de camundongos knockout para TLR2, sendo a resposta inibida em macrófagos tratados com o inibidor TLR4, sugerindo que *M. pneumoniae* também induz respostas inflamatórias através TLR4 [67].

Assim, o presente estudo demonstrou que tanto *U. diversum* como LAMPsUd estimulam a produção de NO e a expressão de IL-1 β e TNF- α . Com base nestes resultados, em um possível mecanismo ureaplasma ou LAMPsUd interagem com TLR4 em um tipo de sinalização envolvendo TLR2. Esta interação promove a ativação de NF- κ B que por sua vez estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) em macrófagos. Este é o primeiro trabalho avaliando a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* e LAMPsUd em macrófagos bovinos, e também o primeiro a mostrar que a sinalização que leva à expressão do perfil pró-inflamatória depende de TLR2 e TLR4 e NF- κ B. Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão da atividade imunomoduladora e patogenicidade desses agentes infecciosos que levam à quadro inflamatório no trato reprodutivo de vacas infectadas, bem como no melhor entendimento dos distúrbios reprodutivos causados.

REFERÊNCIAS

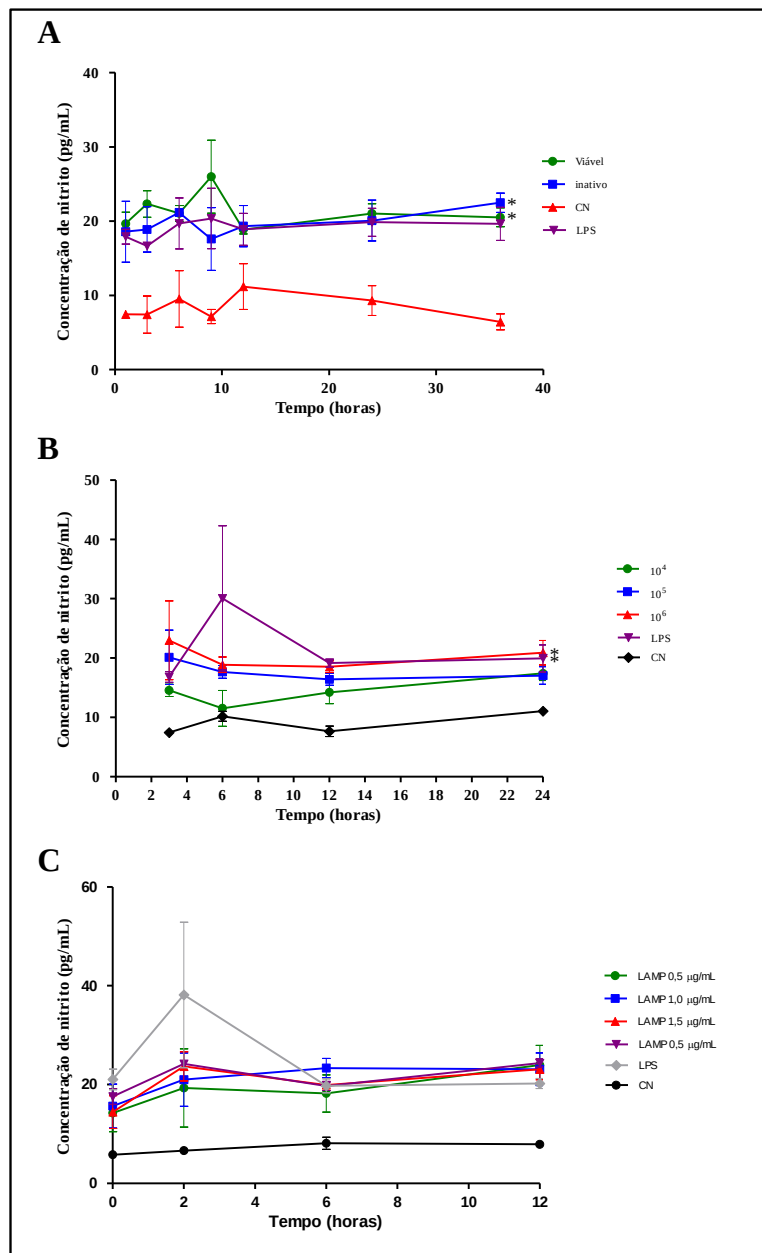
1. Marques L, Buzinhani M, Oliveira R, Yamaguti M, Ferreira J, et al. (2007) Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of calves in Brazil. *Veterinary Record* 161: 699.
2. Maunsell FP, Donovan GA (2009) *Mycoplasma bovis* Infections in young calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25: 139-177, vii.
3. Miller R, Chelmonska-Soyta A, Smits B, Foster R, Rosendal S (1994) *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10: 479-490.
4. Buzinhani M, Yamaguti M, Oliveira RC, Cortez BA, Marques LM, et al. (2011) Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozooids. *BMC Res Notes* 4: 455.
5. Hobson N, Chousalkar KK, Chenoweth PJ (2013) *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: its detection and potential effects. *Aust Vet J* 91: 469-473.
6. Marques LM, Ueno PM, Buzinhani M, Cortez BA, Neto RL, et al. (2010) Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. *BMC Microbiol* 10: 83.
7. Amorim AT, Marques LM, Santos AM, Martins HB, Barbosa MS, et al. (2014) Apoptosis in HEp-2 cells infected with *Ureaplasma diversum*. *Biol Res* 47: 38.
8. Marques LM, Guimaraes AM, Martins HB, Rezende IS, Barbosa MS, et al. (2015) Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782. *Genome Announc* 3.
9. Borges CL, Parente JA, Pereira M, Soares CMdA (2007) Identification of the GTPase superfamily in *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 212-218.
10. Marques LM, Rezende IS, Barbosa MS, Guimaraes AM, Martins HB, et al. (2016) *Ureaplasma diversum* Genome Provides New Insights about the Interaction of the Surface Molecules of This Bacterium with the Host. *PLoS One* 11: e0161926.

11. Pilo P, Vilei EM, Peterhans E, Bonvin-Klotz L, Stoffel MH, et al. (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *Journal of bacteriology* 187: 6824-6831.
12. Ramirez AS, Fleitas JL, Rosales RS, Poveda C, de la Fe C, et al. (2008) A semi-defined medium without serum for small ruminant mycoplasmas. *Vet J* 178: 149-152.
13. Razin S, Hayflick L (2010) Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals* 38: 183-190.
14. Vasconcelos AT, Ferreira HB, Bizarro CV, Bonatto SL, Carvalho MO, et al. (2005) Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* 187: 5568-5577.
15. Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A (1999) Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends in microbiology* 7: 493-499.
16. Wang Y, Liu S, Li Y, Wang Q, Shao J, et al. (2016) *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 β production through the NF- κ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. *Developmental & Comparative Immunology* 55: 111-118.
17. You XX, Zeng YH, Wu YM (2006) Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 7: 342-350.
18. Shibata K-i, Hasebe A, Into T, Yamada M, Watanabe T (2000) The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *The Journal of Immunology* 165: 6538-6544.
19. Hopfe M, Henrich B (2008) OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. *BMC Microbiol* 8: 55.
20. Schmidt JA, Browning GF, Markham PF (2007) *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *J Bacteriol* 189: 3414-3424.
21. Vilei EM, Abdo EM, Nicolet J, Botelho A, Goncalves R, et al. (2000) Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* 146 (Pt 2): 477-486.
22. Vilei EM, Frey J (2001) Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in mycoplasma *mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 85-92.
23. Bolland JR, Dybvig K (2012) *Mycoplasma pulmonis* Vsa proteins and polysaccharide modulate adherence to pulmonary epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 331: 25-30.
24. Sachse K, Helbig JH, Lysnyansky I, Grajetzki C, Muller W, et al. (2000) Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun* 68: 680-687.
25. Peltier MR, Freeman A, Mu HH, Cole BC (2007) Characterization of the Macrophage-Stimulating Activity from *Ureaplasma urealyticum*. *American journal of reproductive immunology* 57: 186-192.
26. Shio MT, Hassan GS, Shah WA, Nadiri A, El Fakhry Y, et al. (2014) Coexpression of TLR2 or TLR4 with HLA-DR Potentiates the Superantigenic Activities of *Mycoplasma arthritidis*-Derived Mitogen. *The Journal of Immunology* 192: 2543-2550.
27. He J, You X, Zeng Y, Yu M, Zuo L, et al. (2009) *Mycoplasma genitalium*-derived lipid-associated membrane proteins activate NF- κ B through toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1750-1757.
28. Garcia J, Lemerrier B, Roman-Roman S, Rawadi G (1998) A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF- κ B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Biological Chemistry* 273: 34391-34398.
29. Rawadi G, Garcia J, Lemerrier B, Roman-Roman S (1999) Signal transduction pathways involved in the activation of NF- κ B, AP-1, and c-fos by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in macrophages. *The Journal of Immunology* 162: 2193-2203.
30. Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2: 675-680.
31. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
32. Schröder NW, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, et al. (2004) Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *The Journal of Immunology* 173: 2683-2691.
33. Arthur JS, Ley SC (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13: 679-692.
34. Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13: 460-469.

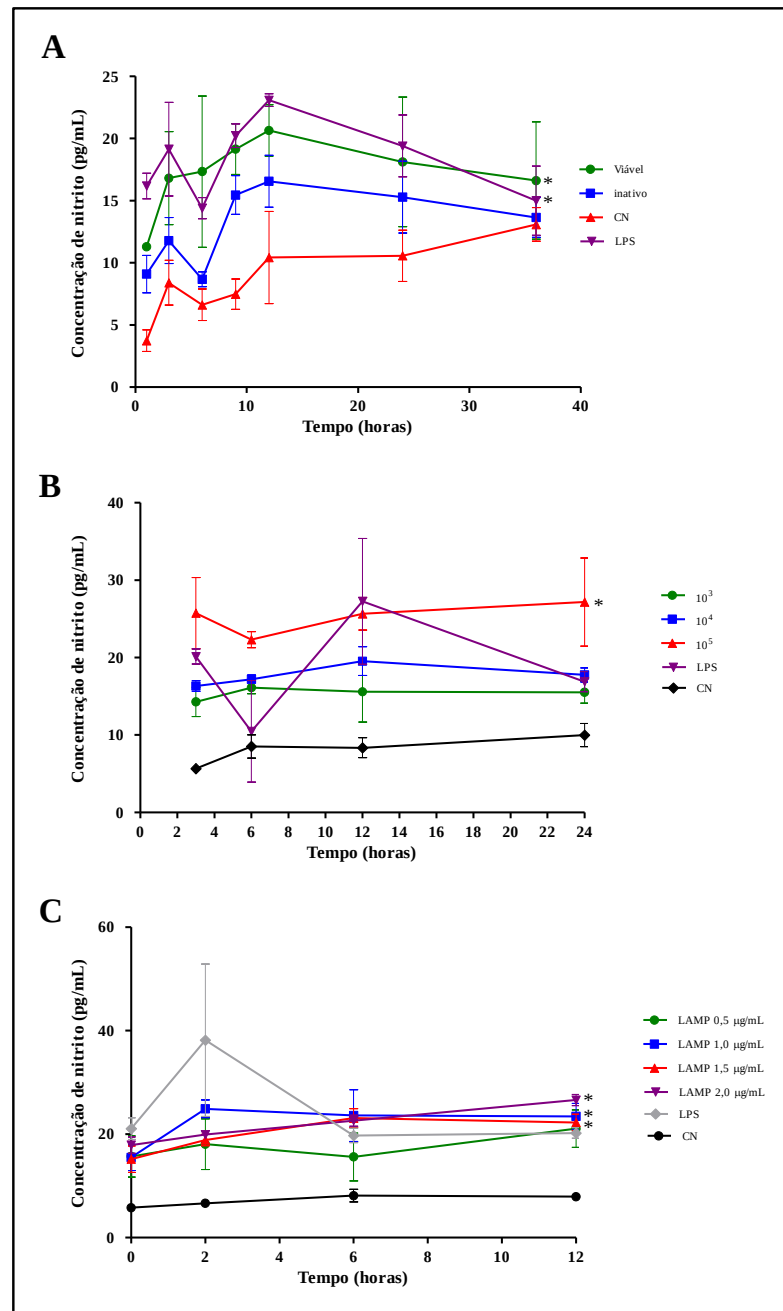
35. Ruhnke HL, Doig PA, MacKay AL, Gagnon A, Kierstead M (1978) Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 42: 151-155.
36. Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Verlengia R, Timenetsky J, et al. (2000a) Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet Microbiol* 72: 241-250.
37. Silva JR, Ferreira LF, Oliveira PV, Nunes IV, Pereira IS, et al. (2016) Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF- α mediated womb inflammation in mice. *An Acad Bras Cienc* 88 Suppl 1: 643-652.
38. Kim JJ, Quinn PA, Fortier MA (1994) *Ureaplasma diversum* infection in vitro alters prostaglandin E2 and prostaglandin F2 α production by bovine endometrial cells without affecting cell viability. *Infection and immunity* 62: 1528-1533.
39. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227: 680-685.
40. Gondaira S, Higuchi H, Iwano H, Nakajima K, Kawai K, et al. (2015) Cytokine mRNA profiling and the proliferative response of bovine peripheral blood mononuclear cells to *Mycoplasma bovis*. *Veterinary immunology and immunopathology* 165: 45-53.
41. Cruz WAdS (2010) Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas [Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo. 57 p.
42. Almeida RA, Rosenbusch RF (1991) Capsulelike surface material of *Mycoplasma dispar* induced by in vitro growth in culture with bovine cells is antigenically related to similar structures expressed in vivo. *Infection and immunity* 59: 3119-3125.
43. Majumder S, Zappulla F, Silbart LK (2014) *Mycoplasma gallisepticum* Lipid Associated Membrane Proteins Up-regulate Inflammatory Genes in Chicken Tracheal Epithelial Cells via TLR-2 Ligation through an NF- κ B Dependent Pathway. *PLoS ONE* 9: e112796.
44. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013) An improvement of the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics* 3: 71.
45. Shirasuna K, Nitta A, Sineenard J, Shimizu T, Bollwein H, et al. (2012) Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic animal endocrinology* 43: 198-211.
46. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K (2008) A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF- κ B through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. *Infection and immunity* 76: 3672-3678.
47. Buzinhani M, Metifogo E, Timenetsky J (2007) Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59: 1368-1375.
48. Cardoso MV, Scarcelli E, Grasso LM, Teixeira SR, Genovez ME (2000b) *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. *Anim Reprod Sci* 63: 137-143.
49. Marques LM, Buzinhani M, Neto RL, Oliveira RC, Yamaguti M, et al. (2009) Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. *Vet Rec* 165: 572-573.
50. Buzinhani M, Buim MR, Yamaguti M, Oliveira RC, Metifogo E, et al. (2007) Genotyping of *Ureaplasma diversum* isolates using pulsed-field electrophoresis. *Vet J* 173: 688-690.
51. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K (2005) A dipalmitoylated lipoprotein from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF- κ B through TLR1, TLR2, and TLR6. *The Journal of Immunology* 175: 4641-4646.
52. Silva JR, Ferreira LF, Oliveira PV, Nunes IV, Pereira ÍS, et al. (2016) Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF- α mediated womb inflammation in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88: 643-652.
53. Chelmonska-Soyta A, Miller R, Ruhnke L, Rosendal S (1994) Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 58: 275.
54. Marques LM, Amorim AT, Martins HB, Rezende IS, Barbosa MS, et al. (2013) A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum*. *Vet Microbiol* 167: 670-674.
55. You X-x, Zeng Y-h, Wu Y-m (2006) Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *Journal of Zhejiang University Science B* 7: 342-350.
56. Qiu H, Wu Y, You X, Yu M, Zeng Y (2007) *Mycoplasma genitalium* lipid-associated membrane proteins induce human monocytic cell express proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor kappaB. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica* 47: 899-904.
57. Dusanic D, Bencina D, Oven I, Cizelj I, Bencina M, et al. (2012) *Mycoplasma synoviae* induces upregulation of apoptotic genes, secretion of nitric oxide and appearance of an apoptotic phenotype in infected chicken chondrocytes. *Veterinary research* 43: 7.
58. Obara H, Harasawa R (2010) Nitric oxide causes anoikis through attenuation of E-cadherin and activation of caspase-3 in human gastric carcinoma AZ-521 cells infected with *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Veterinary Medical Science* 72: 869-874.

59. Muneta Y, Minagawa Y, Shimoji Y, Ogawa Y, Hikono H (2008) Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Veterinary Medical Science* 70: 1065-1070.
60. Damte D, Lee S, Hwang M, Gebru E, Choi M, et al. (2011) Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. *New Zealand veterinary journal* 59: 185-190.
61. Hwang M-H, Chang Z-Q, Kang E-H, Lim J-H, Yun H-I, et al. (2008) Surfactin C inhibits *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced transcription of proinflammatory cytokines and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells. *Biotechnology letters* 30: 229-233.
62. You X, Wu Y, Zeng Y, Deng Z, Qiu H, et al. (2008) *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: 228-236.
63. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K (2008) *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF- κ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 154: 1318-1325.
64. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, et al. (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130: 1071-1082.
65. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn S-J, Ryu YH, et al. (2009) Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31: 873-884.
66. Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, et al. (2004) Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and infection* 6: 946-959.
67. Shimizu T, Kimura Y, Kida Y, Kuwano K, Tachibana M, et al. (2014) Cytoadherence of *Mycoplasma pneumoniae* Induces Inflammatory Responses through Autophagy and Toll-Like Receptor 4. *Infection and Immunity* 82: 3076-3086.

4 MATERIAL SUPLEMENTAR



S1 Fig 7. Dosagem de NO pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos infectadas com cepas de ATCC 49782 ou LAMPsUd em diferentes tempos. (A) Dosagem em sobrenadante de culturas infectadas com cepas ATCC 49782 nas condições viável e inativa nos tempos 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 36 horas. (B) Dosagem em sobrenadante de cultura infectadas com cepa ATCC 49782 em diferentes CCUs nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas. (C) Dosagem em sobrenadante de cultura incubadas com LAMPsUd de ATCC 49782 em diferentes concentrações nos tempos 0, 2, 6 e 12 horas. Os tratamentos foram comparados com controle negativo (CN: inoculação de 100µL de PBS em cultura). Como controle positivo foi utilizado 100U/mL de LPS. A significância estatística ($p < 0.05$) é representada por (*). Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn através do software GraphPad Prism® versão 6.01.



S2 Fig 8. Dosagem de NO pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos infectadas com cepas de IC-GOTA ou LAMPsUd em diferentes tempos. (A) Dosagem de NO em sobrenadante de culturas infectadas com cepas IC-GOTA nas condições viável e inativa nos tempos 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 36 horas. (B) Dosagem de NO em sobrenadante de cultura infectadas com cepa IC-GOTA em diferentes CCUs nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas. (C) Dosagem de NO em sobrenadante de cultura incubadas com LAMPsUd de IC-GOTA em diferentes concentrações nos tempos 0, 2, 6 e 12 horas. Os tratamentos foram comparados com controle negativo (CN: inoculação de 100µL de PBS em cultura) Como controle positivo foi utilizado 100U/mL de LPS. A significância estatística ($p < 0.05$) é representada por (*). Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn através do software GraphPad Prism® versão 6.01.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A Infecção por *U. diversum* em cultura de macrófagos bovinos mostrou que esta bactéria induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias neste modelo, podendo este ser um mecanismo relacionado aos danos provocados pela infecção em vacas e touros.
- Maiores concentrações de *U. diversum* viável ou inativado (cepa ATCC 49782) tende a estimular expressão de IL-1 β , TNF- α , TLR2 e TLR4 em relação concentrações mais baixa.
- As LAMPs da cepa IC-GOTA estimulam a expressão de genes relacionados à resposta pró-inflamatórios. Essas lipoproteínas podem ser responsáveis por parte significativa a resposta imunológica geradas por *U. diversum*.
- *U. diversum* induz aumento na produção de NO durante a infecção. Altas concentrações de NO pode ter relação com a patogenia causada por este micro-organismo, porém, estudos mais específicos devem ser realizados avaliando o papel desta substância.
- Tanto *U. diversum* quanto suas LAMPs estimulam a produção de NO e interagem com TLR4 em um tipo de sinalização que envolve TLR2. Esta interação ativa NF- κ B que por sua vez atua estimulando a expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) em macrófagos.
 - Este é o primeiro trabalho avaliando a resposta imunológica gerada contra *U. diversum* e suas LAMPs em macrófagos bovinos, e também o primeiro a mostra que a sinalização que leva a expressão de perfil pró-inflamatório depende de TLR2 e TLR4 e NF κ B.