

Mateus Laguardia Nascimento

**Análise do microbioma vaginal bovino por técnicas
dependentes e independentes de cultivo**

Belo Horizonte

2015

Mateus Laguardia Nascimento

Análise do microbioma vaginal bovino por técnicas dependentes e independentes de cultivo

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edel Figueiredo Barbosa Stancioi

Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Belo Horizonte

2015

Lista de abreviaturas e siglas

Anualpec – Anuário da pecuária brasileira

AS – Ágar Sangue

BAL – Bactérias ácido-láticas

BHI – Infusão de cérebro e coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)

BoHV – Herpesvírus bovino (*Bovine herpesvirus*)

BVDV – Vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*)

DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

DO – Densidade óptica

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização para alimentação e agricultura das Nações Unidas (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

Kg – Quilogramas

Kb - Quilobases

MATH – Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (do inglês *Microbial Adhesion to Hydrocarbons*)

MG-RAST – Anotação Rápida Metagenômica utilizando Tecnologia de Subsistemas (do inglês *Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology*)

ml – Mililitros

mM – Milimolar

MRS – Meio de Man, Rogosa e Sharpe

ng – Nanogramas

nm – Nanômetros

NP – Novilhas Prenhes

NV – Novilhas Vazias

OTU – Unidade Taxonômica Operacional (do inglês *Operational Taxonomic Unit*)

PBS – Salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

PIB – Produto Interno Bruto

pH – Potencial Hidrogeniônico

pmol - Picomoles

RNA – Ácido Ribonucléico (do inglês *Ribonucleic acid*)

mRNA – RNA mensageiro

rRNA – RNA ribossomal

TE – Tampão Tris-EDTA

TGI – Trato Gastrointestinal

TGU – Trato Geniturinário

TMB - Tetrametilbenzidina

U – Unidades de Enzima

UE – União Europeia

UFC – Unidades formadoras de colônias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês *United States Department of Agriculture*)

VP – Vacas Prenhes

VV – Vacas Vazias

v/v – Volume / Volume

WHO – Organização mundial da saúde (do inglês *World Health Organization*)

μl – Microlitros

μM – Micromolar

Resumo

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, e o segundo em número de cabeças, sendo a atividade agropecuária uma importante parte da economia no país. Até hoje os estudos envolvendo a microbiota dos bovinos, utilizando técnicas dependentes ou independentes de cultivo, tiveram como principal alvo o trato gastrointestinal, sendo o trato geniturinário pouco conhecido neste aspecto, apesar de sua importância. Este estudo teve como objetivo a caracterização da microbiota do trato vaginal de novilhas e vacas da raça Nelore, prenhes e vazias, utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo e a seleção de potenciais probióticos para o tratamento de infecções geniturinárias.

Os resultados provenientes das técnicas independentes de cultivo mostraram uma grande diversidade de bactérias e baixa diversidade de arqueias e fungos. Os filos bacterianos dominantes foram *Firmicutes* (~40 a 50%), *Bacteroidetes* (~15 a 25%) e *Proteobacteria* (~5 a 25%), além de um total de ~10 a 20% de bactérias não classificadas. Quanto aos gêneros, observou-se uma grande diversidade de microrganismos dominantes, sendo as dez OTUs mais abundantes (~45 a 55%): *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Rikenella*, *Alistipes*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Prevotella* e bactérias não classificadas. Dentre as arqueias, houve um grande predomínio do gênero *Methanobrevibacter* (*Euryarchaeota*, ~55 a 70%). Os ascomicetos foram a maioria dentre os fungos (~80 a 95%), com grande destaque para o gênero *Mycosphaerella* (~70 a 85%).

Estes dados indicam uma grande influência da microbiota do trato gastrointestinal na colonização do trato vaginal, o que já foi relatado para outras espécies animais e pode ser explicado pela proximidade entre os dois tratos. A influência hormonal não foi clara, mas foi possível detectar uma tendência de redução do número total de bactérias nos animais prenhes e um aumento de arqueias. Os eucariotos não variaram de forma significativa entre animais prenhes e vazios, mas houve uma tendência das vacas apresentarem maior abundância destes organismos que as novilhas.

Foram isolados 69 clones bacterianos das amostras cultivadas, sendo a grande maioria (60) pertencente ao gênero *Escherichia*. Os testes de antagonismo, co-agregação, hidrofobicidade e produção de peróxido de hidrogênio realizados com 11 desses isolados apontaram três deles com elevado potencial probiótico, e mais quatro com potencial mediano.

Em relação à abundância dos cultiváveis, houve uma clara influência do estado hormonal e da idade dos animais no isolamento, sendo observada maior abundância em animais prenhes (em relação aos vazios) e em vacas (em relação às novilhas).

Os resultados aqui descritos evidenciam uma grande variabilidade na microbiota do trato vaginal entre os animais e grupos testados, e uma grande diferença entre os achados dependentes e independentes de cultivo, pontuando a necessidade de maiores estudos neste trato. A colonização do trato vaginal parece ser influenciada pelo trato gastrointestinal.

Palavras-chaves:

Trato Vaginal, Bovino, Microbiota, Metagenômica, Probiótico.

Abstract

Brazil possesses the most important commercial herd in the world and the second largest one, making livestock an important part of the national economy. To date, studies involving cattle microbiota, using both culture dependent and independent methods, focused on the gastrointestinal tract, and little is known about the microbiota of the also important genitourinary tract. This study aimed the microbial characterization of the bovine vaginal tract of heifers and cows, pregnant and non-pregnant, using both culture dependent and independent approaches, as well as the selection of potential probiotics for the treatment of genitourinary infections.

Data provided by the culture independent techniques showed great bacterial diversity, but a diminished archaeal and fungal diversity. The main bacterial phyla found were *Firmicutes* (~40-50%), *Bacteroidetes* (~15-25%) and *Proteobacteria* (~5-25%), in addition to ~10-20% non-classified bacteria. A variety of genera dominates this microbiome, although ~45-55% of the samples are represented by only ten OTUs, namely *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Rikenella*, *Alistipes*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Prevotella* and non-classified bacteria. Archaeal samples are dominated by *Methanobrevibacter* (*Euryarchaeota*, ~55-70%). *Ascomycota* is the main fungal phylum (~80-95%) and *Mycosphaerella* the most abundant genus (~70-85%).

These data indicate a great influence of the gastrointestinal microbiota on the colonization of the vaginal tract, event that has already been proposed for other animal species and could be explained by the proximity between these tracts. Hormonal influence was not clear, but a tendency for the reduction of the bacterial population and increase of the archaeal population on pregnant animals was observed. Eukaryotes do not vary significantly among pregnant e non-pregnant animals, but tended to be more abundant on cows than on heifers.

A total of 69 bacterial clones were isolated from cultivated samples, most of them (60) belonging to the *Escherichia* genus. Antagonism, co-aggregation, hydrophobicity, and hydrogen peroxide production tests were performed on 11

isolates, resulting on the identification of three samples with high potential for probiotic use, and four with a median potential.

There was clear hormonal and age influence on the abundance of the cultured organisms, with higher isolates abundance in the pregnant group than in the non-pregnant group and in cows than in heifers.

The present work describes a great microbial variability on the vaginal community among the tested animals and groups, and a significant difference between the findings using culture dependent and independent methods, pointing the need for further studies on this matter. Vaginal colonization appears to be influenced by the gastrointestinal community.

Keywords:

Vaginal Tract, Cattle, Microbiota, Metagenomics, Probiotic

Agradecimentos

Quando um biólogo, virologista, decide realizar um trabalho envolvendo bactérias, arqueias, fungos, vacas e bioinformática, o que não faltam são pessoas para agradecer, portanto tentarei ser breve sem esquecer de ninguém, mesmo sabendo de antemão que isso não será possível.

Inicialmente, agradeço a Deus pela vida, pois todo o resto é consequência dela. Agradeço à minha família (de nascimento, de casamento, de todas as formas), todos os componentes deste curioso mosaico que se ajuntam para formar um quadro mais belo que qualquer peça individual. Eu, como peça mais bizarra, devo toda minha formação ao que por eles me foi permitido, e meu caráter ao que também por eles não me foi. Quando penso em tudo que me trouxe até aqui, só posso sentir humildade e gratidão a vocês.

Acredito que a personalidade de uma pessoa é finamente forjada por seus amigos. Neste quesito, também fui abençoado. Devo muito a todos que me apoiaram e me deram suporte ao longo de todos esses anos, em especial aos Felas, afinal, amigos de infância você só pode fazer durante uma curta parte da vida, embora precise deles para sempre.

Agradeço imensamente a todo o grupo do LVBA, coordenado pelos professores Flávio e Edel, por todo o companheirismo, amizade, ideias, e aquela sempre providencial ajuda para resolver os problemas que aparecem ao longo do doutorado e que costumam a ir embora. Tenho orgulho de ter feito parte de um grupo de tamanha excelência por tanto tempo.

Ao LEFM, em especial ao Léo e ao Rafa, por terem ajudado imensamente nos experimentos envolvendo bactérias. Saibam que sem a ajuda de todos vocês essa parte do trabalho simplesmente não existira. Agradeço muito a hospitalidade com a qual fui recebido, que fez com que eu não me sentisse tão estranho no ninho da bacteriologia! Agradeço também ao MOA, aos professores Luiz, Dodora e Simone. Este pobre virologista tornou-se um microbiologista mais completo graças à ajuda de vocês.

Acelerando o passo um pouco, agradeço ao departamento de microbiologia e à secretaria de pós-graduação, por todo o suporte ao longo desses anos, e pela paciência com as dezenas de alunos desesperados que sempre aparecem.

À fazenda que me recebeu, também de braços abertos, para realização das coletas. Uma fazenda de elite, nos moldes que este trabalho requeria, não foi fácil de encontrar, e talvez por isso eu não esperasse tamanha abertura por parte do proprietário e do gerente durante toda a realização deste trabalho.

Em especial, gostaria de agradecer às pessoas diretamente envolvidas nesse trabalho: primeiramente à Dra. Marcela Gasparini, que me ensinou tudo para realizar as coletas e este estudo em bovinos! Sua contribuição, como você bem sabe, foi essencial! Em seguida, à Dra. Kelly Grillo, que me direcionou na parte de bacteriologia! Além de ajudar na coleta dos animais, sem sua ajuda seria impossível plaquear tantas amostras no mesmo dia! Obrigado por todos os ensinamentos! À minha padawan Silvinha, por toda a ajuda na parte final do trabalho, e por assumir a continuidade do trabalho daqui por diante.

Aos professores Edel e Jacques meu agradecimento mais do que especial. Obrigado Edel, por tudo que aprendi ao longo destes quase dez anos sob sua orientação. Trabalhar ao seu lado foi um prazer imenso, não só pela formação científica, mas também pela formação pessoal. Agora terminamos uma grande etapa, mas a amizade e o companheirismo serão eternos! Ao professor Jacques também, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim num momento complicado do trabalho, o que foi essencial para os resultados aqui apresentados. Jamais poderei colocar em palavras ou quantificar todas as contribuições que você deu.

Finalmente, agradeço à minha esposa, Paulinha, por todos os anos ao meu lado. Se todas as pessoas citadas ao longo deste extenso agradecimento trouxeram contribuições importantes ao meu trabalho e à minha vida pessoal, você muito mais! Obrigado pelo apoio, amor, suporte, ideias, compreensão e tudo mais que um homem poderia pedir. Te amo demais!

Sumário

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 A bovinocultura no Brasil e no mundo.....	2
1.1.1 Números	2
1.1.2 O rebanho brasileiro	4
1.2 Microbiota indígena.....	4
1.2.1 Microbiota indígena do trato vaginal de fêmeas bovinas e de outros mamíferos.....	5
1.3 Infertilidade e doenças relacionadas ao trato geniturinário bovino.....	6
1.3.1 Agentes virais	7
1.3.2 Agentes bacterianos	7
1.3.3 Agentes protozoóticos	8
1.3.4 Infecções pós-parto	8
1.4 Metagenômica.....	9
1.4.1 Histórico.....	9
1.4.2 Sequenciamento pelo MiSeq	10
1.4.3 Os estudos de metagenômica em bovinos	11
1.5 Probiótico	12
1.5.1 Probióticos para vacas.....	13
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Escolha da fazenda e coleta das amostras.....	21

4.1.1 Lavado cérvico-vaginal	21
4.2 Análise metagenômica dos lavados	22
4.2.1 Extração dos ácidos nucleicos genômicos de cada lavado	22
4.2.2 Precipitação do ácido nucleico extraído.....	23
4.2.3 Amplificação e purificação do DNA para sequenciamento metagenômico	23
4.2.4 Construção das bibliotecas e sequenciamento metagenômico	25
4.2.5 Tratamento e análise dos dados obtidos	26
4.3 Isolamento, caracterização morfo-tintorial e identificação dos microrganismos isolados do trato geniturinário de fêmeas bovinas.....	27
4.3.1 Isolamento	27
4.3.2 Manutenção e conservação das amostras isoladas	27
4.3.3 Caracterização presuntiva dos isolados	28
4.3.4 Identificação.....	28
4.4 Pesquisa do potencial probiótico de microrganismos isolados do trato geniturinário de fêmeas bovinas	29
4.4.1 Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i>	29
4.4.2 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio	30
4.4.3 Teste de hidrofobicidade.....	30
4.4.4 Teste de co-agregação com bactérias patogênicas.....	31
4.4.5 Análises estatísticas empregadas.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Coleta e agrupamento das amostras	33
5.2 Análises metagenômicas	33
5.2.1 Análise da precipitação dos <i>amplicons</i> em gel de agarose	33
5.2.2 Composição das bibliotecas, curvas de rarefação e diversidade alfa das amostras	34
5.2.3 Análise dos metagenomas.....	38

5.2.4 Análise dos domínios.....	38
5.2.5 Bactérias.....	39
5.2.6 Arqueias.....	52
5.2.7 Eucariotos.....	54
5.3 A relação TGI x trato vaginal em vacas	57
5.4 A formação e a manutenção da microbiota vaginal em bovinos	59
5.5 Análises dos microrganismos cultiváveis isolados	60
5.5.1 Análise e quantificação das colônias isoladas	60
5.5.2 Análise morfo-tintorial dos isolados	63
5.5.3 Sequenciamento tradicional das bactérias isoladas	63
5.5.4 Ensaio de antagonismo.....	65
5.5.5 Produção de peróxido de hidrogênio	67
5.5.6 Teste de hidrofobicidade.....	67
5.5.7 Teste de co-agregação	67
5.5.8 Escore padronizado dos candidatos a probiótico.....	69
6 CONCLUSÕES	72
7 PERSPECTIVAS	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Maiores rebanhos mundiais	2
Tabela 2 - Maiores exportadores de carne bovina	3
Tabela 3 – Iniciadores universais utilizados nas reações de PCR	24
Tabela 4 – Identificação dos animais coletados	33
Tabela 5 – Análise das bibliotecas geradas	35
Tabela 6 – Quantificação do isolamento das amostras de lavado	61
Tabela 7 – Resultado do ensaio de antagonismo	66
Tabela 8 – Resumo do teste de co-agregação.....	68
Tabela 9 – Escore padronizado.....	70

Lista de Figuras

Figura 1 – Amplificação por ponte.....	11
Figura 2 - Lavado vaginal sendo realizado.....	22
Figura 3 – Análise dos precipitados em gel de agarose.....	34
Figura 4 – Curvas de rarefação de todas as 20 bibliotecas bacterianas.....	36
Figura 5 – Diversidade alfa média dos grupos analisados.....	38
Figura 6 – Abundância dos domínios encontrados nas amostras.....	39
Figura 7 – Variação hormonal ao longo do ciclo estral das vacas.....	40
Figura 8 – Filos de <i>Bacteria</i>	42
Figura 9 – OTUs mais abundantes de <i>Bacteria</i> , em nível de gênero.....	43
Figura 10 – Árvore filogenética destacando as famílias mais abundantes.....	44
Figura 11 – As dez OTUs bacterianas mais abundantes em cada animal.....	47
Figura 12 – Análise das OTUs bacterianas mais abundantes em cada um dos três grupos criados com base no perfil da microbiota.....	48
Figura 13 – As 10 OTUs mais abundantes dentre as de grande variação.....	50
Figura 14 - OTUs mais abundantes de Arqueias, em nível de gênero.....	54
Figura 15 – OTUs mais abundantes de Fungos, em nível de filo.....	55
Figura 16 - OTUs mais abundantes de Fungos, em nível de gênero.....	57
Figura 17 – Representação do aparelho reprodutivo de uma vaca.....	58
Figura 18 – Região posterior do animal no momento da coleta.....	59
Figura 19 – Imagem representativa dos morfotipos isolados dos lavados.....	64
Figura 20 – Imagem representativa da análise morfo-tintorial dos isolados.....	64
Figura 21 – Árvore filogenética das OTUs encontradas dentre as famílias bacterianas presentes nas amostras.....	65
Figura 22 – Antagonismo negativo usando <i>Staphylococcus chromogenes</i> como bactéria reveladora em meio BHI.....	66
Figura 23 – Antagonismo positivo entre duas das bactérias testadas crescidas em ágar MRS e o revelador <i>Staphylococcus chromogenes</i>	66
Figura 24 – Produção de peróxido de hidrogênio.....	67
Figura 25 – Coloração de Gram de um teste de co-agregação.....	68

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A bovinocultura no Brasil e no mundo

1.1.1 Números

A criação de gado há milhares de anos acompanha o homem, com os objetivos de alimentação, vestuário, força de trabalho e, mais recentemente, financeiro. Desde seus primórdios, esta atividade cresceu muito e hoje estima-se que haja mais de um bilhão de cabeças de gado no mundo, uma para cada sete pessoas, segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA, 2015).

Atualmente, o Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo, superado apenas pela Índia, sendo o Brasil o único dos cinco maiores bovinocultores mundiais que aumentou seu rebanho em comparação ao ano de 2010 - todos os outros apresentaram queda (Tabela 1). Comercialmente, o rebanho brasileiro também é um dos que mais se destaca no mundo. Há muitos anos o país lidera o mercado mundial em exportação de carne bovina, seguido de perto pela Índia (Tabela 2), e a pecuária é uma importante atividade econômica no país. Apenas em 2012, o faturamento se aproximou dos US\$ 5,8 bilhões, um recorde no setor. O Brasil também é o segundo maior produtor e exportador de couro, tendo exportado mais de 400 milhões de quilos de couro e pele bovinos em 2012, gerando mais de US\$ 2 bilhões (ANUALPEC, 2013).

Rebanho (em milhões de cabeças)						
País	Referência					
	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (Out)
Índia	304,500	302,500	300,000	299,606	300,600	301,000
Brasil	185,159	190,925	197,550	203,273	207,960	212,700
China	107,265	106,264	103,605	103,434	103,000	102,950
EUA	94,081	92,887	91,160	90,095	87,730	87,750
União Europeia	89,829	87,831	87,054	87,106	87,645	88,050

Tabela 1 - Maiores rebanhos mundiais. Adaptado de USDA, 2015.

A produção leiteira também é um fator importante na economia nacional. Somente em 2011, a produção de leite no país girou em torno de 32 bilhões de litros, gerando R\$ 31,3 bilhões. Em 2012 houve um aumento de cerca de 3%, e a mesma projeção foi estimada para 2013, o que levaria a produção nacional a um máximo de 34 bilhões de litros (ANUALPEC, 2013). Destaca-se o papel do estado de Minas Gerais nesse contexto. Em 2011, o estado foi responsável por mais de 8,7 bilhões de litros, mais que o dobro do segundo colocado, Rio Grande do Sul, com 3,8 bilhões (ANUALPEC, 2013). Apesar dos números impressionantes, o Brasil ainda é apenas o quarto maior produtor mundial de leite, atrás da União Europeia (UE), Estados Unidos e Índia, demonstrando a possibilidade de expansão deste mercado no país (ANUALPEC, 2013).

O mercado de sêmen bovino também possui grande relevância no cenário nacional. Apenas em 2014, mais de 12 milhões de doses de sêmen foram efetivamente comercializadas. Estima-se que cerca de 12% do rebanho brasileiro seja inseminado, segundo dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2014).

Exportações (em milhares de toneladas equivalente carcaça)						
País	Referência					
	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (Outubro)
Brasil	1558	1340	1524	1849	2030	2235
Índia	917	1268	1411	1765	1850	1950
Austrália	1368	1410	1407	1593	1775	1590
EUA	1043	1263	1112	1175	1179	1145
Nova Zelândia	530	503	517	529	570	575

Tabela 2 - Maiores exportadores de carne bovina. Adaptado de USDA, 2014.

Todos estes números demonstram a importância da pecuária e do agronegócio para a economia brasileira. De fato, em 2012, a agropecuária foi responsável por quase um quarto do PIB nacional, e por US\$ 80 bilhões em exportações, garantindo o saldo positivo da balança comercial nacional (ANUALPEC, 2013).

1.1.2 O rebanho brasileiro

Um país de dimensões continentais, o Brasil possui diversidade de climas, solos e pastagens, todavia a maioria do país apresenta clima equatorial, com altas temperaturas médias anuais. Como resultado, a maior parte do rebanho brasileiro é composta por gado da subespécie *Bos taurus indicus*, o gado zebuíno. Proveniente da Ásia, esta subespécie é conhecida por apresentar maior rusticidade e maior tolerância às altas temperaturas. Consequentemente, 80% do gado nacional é zebuíno, que melhor responde ao clima presente na maior parte do território nacional. Dentre os zebuínos destaca-se o gado Nelore, 90% de todo o gado zebuíno brasileiro (ANUALPEC, 2010). Outras raças zebuínas também importantes no país são Gir e Guzerá.

O gado taurino, *Bos taurus taurus*, compõe 20% do rebanho nacional, e está concentrado na região sul do país, onde o clima é mais ameno, mais próximo do clima da região de origem deste gado, a Europa. Esta subespécie apresenta menor rusticidade, mas maiores volumes de produção de leite. As raças de maior importância para o rebanho brasileiro são Holandês, Gersey e Suíço. O gado que vem ganhando bastante espaço entre os produtores leiteiros no Brasil é o Girolando, resultado do cruzamento de Gir e Holandês. O resultado deste cruzamento garante maior rusticidade às crias, sem prejudicar a produção de leite (ANUALPEC, 2010).

1.2 Microbiota indígena

Todos os seres vivos, qualquer que seja o seu tamanho, abrigam nas suas superfícies e mucosas numerosas populações de microrganismos, globalmente denominadas microbiota indígena. Em um ser humano adulto, estima-se que essa microbiota é constituída por 10^{14} células vivas, com peso aproximado de 1,5 kg e atividade metabólica similar à de um fígado. Esses dados apontando para a presença de populações consideráveis de microrganismos no ser humano podem ser extrapolados proporcionalmente para qualquer espécie animal (NICOLI; VIEIRA, 2004).

No trato digestivo, em condições normais, essa microbiota oferece pelo menos três grandes benefícios: resistência à colonização, que impede a instalação e a multiplicação de microrganismos patogênicos; imunomodulação, que permite uma resposta imunológica mais rápida e adequada em caso de infecções; e contribuição nutricional, que fornece fontes complementares de energia, enzimas e vitaminas, e estimula a multiplicação e diferenciação celular do epitélio intestinal (NICOLI; VIEIRA, 2004). Como para outras mucosas do corpo, a microbiota indígena da vagina (microbiota de Doderlein) protege o trato geniturinário contra bactérias potencialmente patogênicas por meio da competição por nutrientes, produção de substâncias antagonistas e/ou interferência na adesão aos receptores das células epiteliais (REID, 1999).

Estudos realizados por Reid e colaboradores (REID et al., 2003) com 64 mulheres que ingeriram diariamente cápsulas contendo *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus fermentum* RC-14, por um período de dois meses, comprovam a origem intestinal de, pelo menos, parte dos microrganismos que colonizam o trato urogenital. Observou-se na microbiota vaginal dessas pacientes, aumento significativo do número de *Lactobacillus* e diminuição de contagens de leveduras e coliformes. Além da influência da microbiota do trato gastrointestinal, foi observado que, em mulheres em idade reprodutiva, o estrogênio estimula a proliferação de células epiteliais, que produzem altos níveis de glicogênio, o que favorece a multiplicação dos lactobacilos, que se tornam as bactérias predominantes no canal vaginal. O metabolismo do glicogênio pelos lactobacilos resulta no aumento de ácido láctico e outros ácidos orgânicos no meio, que diminuem o pH vaginal, o que constitui um fator limitante para o crescimento de muitos microrganismos (BOSKEY et al., 1999).

1.2.1 Microbiota indígena do trato vaginal de fêmeas bovinas e de outros mamíferos

A microbiota indígena da vagina de mulheres saudáveis é dominada por espécies do gênero *Lactobacillus*. Algumas espécies reportadas são *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, dentre outras

(ANTONIO; HAWES; HILLIER, 1999). Estudos do ecossistema vaginal de mulheres saudáveis conduzidos por Dumonceaux e colaboradores (DUMONCEAUX et al., 2009) demonstraram uma baixa diversidade de bactérias e confirmaram a predominância de espécies do gênero *Lactobacillus*. Esses trabalhos sugerem que, ao contrário do ecossistema microbiano gastrointestinal, em que a potência das funções benéficas da microbiota está relacionada à rica biodiversidade, um ecossistema vaginal saudável é caracterizado por uma baixa diversidade microbiana, que consiste quase exclusivamente de *Lactobacillus* (BRANCO et al., 2010).

Diferentemente do que se encontra para mulheres, macacas e ratas (HERTHELIUS et al., 1989; REID et al., 1985), a microbiota do trato vaginal das vacas apresenta uma microbiota mais diversa e mais escassa. Embora não haja muitos estudos descritivos neste campo, pesquisas indicam que a microbiota normal do trato geniturinário (TGU) de bovinos é composta por uma mistura dinâmica de microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios (Ramaswamy et al. 1991 e Sharda et al., 1991 *apud* SILVA et al., 2011).

Otero e colaboradores (OTERO et al., 1999) estudaram a variação qualitativa e quantitativa da microbiota indígena da vagina de vacas no decorrer do ciclo estral, com foco nos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Foi verificada a presença de microrganismos do gênero *Lactobacillus* em baixas contagens, entre 10^0 e 10^2 unidades formadoras de colônias (UFC)/amostra. Isso também foi observado para microrganismos do gênero *Enterococcus*, que apresentaram contagens entre 10^2 e 10^4 UFC/amostra ao longo do ciclo estral. Estudos em novilhas, conduzidos por Amin e colaboradores (AMIN; ZARIA; MALGWI, 1996), inferiram que a pequena variedade microbiana, assim como as baixas taxas de isolamento de bactérias entre novilhas, sugere que a maturidade sexual e/ou a cópula contribui de forma importante para a microbiota vaginal.

1.3 Infertilidade e doenças relacionadas ao trato geniturinário bovino

Devido à importância econômica da atividade de bovinocultura para o Brasil e no mundo, patologias que levem ao insucesso reprodutivo ou redução na taxa de

fertilidade dos animais são de extrema importância e incluem balanopostite, produção de espermatozoides de má qualidade, retorno ao cio, retenção placentária, abortamentos, metrites, endometrites, ocorrência de natimortos e nascimento de crias fracas, dentre outros. Sheldon e colaboradores, (SHELDON et al., 2008) estimaram que as perdas diretas relacionadas apenas às doenças uterinas em vacas na União Europeia (UE) chegariam a mais de € 206 milhões, e que as perdas indiretas atingiriam o dobro deste valor. As causas dessas condições em bovinos são variadas, podendo ter origem genética, ambiental, nutricional, física, tóxica, infecciosa (viral, bacteriana, fúngica ou protozoóticas) (GIVENS, 2006; JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006; VANROOSE; DE KRUIF; VAN SOOM, 2000; YAEGER et al., 1998), ou até mesmo desconhecida, como para a retenção de placenta (SHELDON et al., 2008). Dentre as causas infecciosas, se destacam algumas em especial, descritas a seguir:

1.3.1 Agentes virais

O Herpesvirus bovino 1 (*Bovine herpesvirus 1* - BoHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus* - BVDV) são agentes de alta prevalência e que podem causar a balanopostite infecciosa em machos, levando à infertilidade (GIVENS; MARLEY, 2008; WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006), e também podem estar associados e serem transmitidos pelo sêmen (ELAZHARY et al., 1980; GIVENS; MARLEY, 2008; LEINBACH et al., 1976; VAN OIRSCHOT et al., 1995). Grande parte dos abortos são relacionados ao BoHV-1 (GIVENS, 2006; KIRKBRIDE, 1992a, 1992b), que na fêmea pode causar também vulvovaginite pustular infecciosa (GIVENS, 2006).

1.3.2 Agentes bacterianos

Campylobacter fetus venerealis é uma bactéria envolvida nos quadros de vaginite, cervicite, endometrite, infertilidade e morte de embrião/feto em fêmeas. Embora não cause doença em machos, pode infectá-los e ser transmitida para fêmeas durante a monta e pode estar presente também no sêmen (BONDURANT, 2005; GIVENS; MARLEY, 2008; GIVENS, 2006). Já a

subespécie *Campylobacter fetus fetus* é comensal dos intestinos, transmitida pela via oral, mas pode estar envolvida em abortos (MSHELIA et al., 2010). *Brucella abortus* também pode infectar machos, causando epididimite, vesiculite e infertilidade (GIVENS; MARLEY, 2008). A infecção por *Leptospira* pode ser esporádica ou duradoura, e pode causar abortos, mastite, infertilidade e queda na produção de leite. Esta bactéria também pode ser transmitida via monta ou via urina (GIVENS, 2006).

Avaliando 2823 fêmeas mestiças Girolando em 34 propriedades leiteiras de Goiânia, Andrade e colaboradores (ANDRADE et al., 2005) destacaram a ocorrência de alterações inflamatórias uterinas diversas, feto macerado, natimortalidade, retenção placentária, cervicite e abortamento. Nas infecções uterinas os autores destacaram como agentes mais comumente isolados *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, pontuando a importância das bactérias residentes nos quadros de diminuição de índices reprodutivos.

1.3.3 Agentes protozoóticos

Trichomonas foetus, assim como a bactéria *C. fetus*, é transmitido durante a monta, não causando doença no macho, mas podendo causar vaginite, cervicite, abortos, endometrite e infertilidade em fêmeas. Pode induzir abortos e estar presente no sêmen (BONDURANT, 2005; GIVENS; MARLEY, 2008; GIVENS, 2006).

1.3.4 Infecções pós-parto

Infecções pós-parto também são notavelmente frequentes entre as fêmeas (SHELDON et al., 2008). Em média, 20-40% desenvolvem metrite até uma semana após o parto, 20% apresentam quadro persistente por até 3 semanas (endometrite) e 30% adquirem uma inflamação crônica subclínica do útero (endometrite subclínica) (BORSBERRY; DOBSON, 1989; DRILLICH et al., 2001; MARKUSFELD, 1987; OPSOMER et al., 2000; SHELDON et al., 2006, 2008, 2009). A determinação da microbiota residente pré e pós-parto seria de grande valia nos estudos e na prevenção destes quadros, uma vez que se acredita que

o estabelecimento da endometrite dependa da relação entre o sistema imune do hospedeiro e as espécies e quantidades de bactérias presentes (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000; KIM; KANG, 2003; SHELDON et al., 2009).

A quantidade de doenças infecciosas do trato geniturinário bovino torna esse sistema um interessante alvo de estudo. É interessante também notar que várias das causas de queda dos índices de fertilidade se mostram diferentes entre vacas primíparas (de primeiro parto) e múltíparas (que já pariram mais de uma vez), possivelmente associando a quantidade de partos a um aumento nos problemas reprodutivos (GALON; ZERON; EZRA, 2010).

1.4 Metagenômica

1.4.1 Histórico

Os microrganismos constituem uma das mais antigas, amplas e diversificadas categoria de organismos. Estes organismos já foram encontrados em fósseis de cerca de 3,5 bilhões de anos, e estima-se que apenas os procariotos sejam em número de $4-6 \times 10^{30}$ organismos no planeta (SINGH et al., 2009; WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998), ocupando os ambientes mais complexos e extremos. Esta grande diversidade esconde uma ainda maior riqueza de genes e funcionalidades, que podem ter impactos sobre o estudo de ecologia, patologias, biotecnologia e sobre o desenvolvimento de novos campos de conhecimento. Porém, estima-se que apenas 1–15% dos microrganismos podem ser cultivados e estudados em laboratório (LANE et al., 1985; SINGH et al., 2009) e essa proporção é ainda menor em alguns ecossistemas: apenas 0,001-0,1% dos microrganismos marinhos, 0,25% dos microrganismos de sedimentos e 0,3% dos microrganismos de solo podem ser cultivados *in vitro* com as técnicas atuais (AMANN et al., 1995; SINGH et al., 2009). Para o estudo completo da microbiota dos ecossistemas, seria necessária uma estratégia independente de cultivo, e com esse fim nasceu a metagenômica.

O termo metagenômica foi cunhado por Handelsman e colaboradores (HANDELSMAN et al., 1998), porém suas técnicas começaram a ser empregadas no início dos anos 90, para diferentes ecossistemas, como água e

solo (DELONG, 2005; HEALY et al., 1995; KUSKE; BARNS; BUSCH, 1997; SCHMIDT; DELONG; PACE, 1991; STEIN et al., 1996). A partir da década de 2000, os estudos com bibliotecas metagenômicas cresceram muito em importância e em quantidade, sendo realizados tanto para a determinação da microbiota de animais e ecossistemas, quanto para o estudo de novos organismos e de genes e vias bioquímicas de interesse comercial (BANIK; BRADY, 2010; BÉJÀ et al., 2000; DIAZ-TORRES et al., 2003; GILL et al., 2006; HENNE et al., 2000; RONDON et al., 2000; TASSE et al., 2010).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas plataformas e técnicas de sequenciamento, o método tradicional de Sanger perdeu espaço para tecnologias mais rápidas e abrangentes, além de mais baratas em relação ao custo por base sequenciada.

1.4.2 Sequenciamento pelo MiSeq

Proposto em 2006 (LIU et al., 2012), o sistema de sequenciamento envolvendo amplificação por ponte (Figura 1) desenvolvido pela empresa Solexa foi um dos pioneiros no sequenciamento de nova geração, juntamente com os sistemas 454 e SOLiD (LIU et al., 2012). No ano seguinte, a empresa foi adquirida pela Illumina, e este sistema de sequenciamento em particular evoluiu muito desde então, ampliando sua aceitação, e nos dias de hoje domina o mercado (QUAIL et al., 2012). O sistema MiSeq foi lançado em 2011 (LIU et al., 2012), baseando-se na mesma tecnologia de amplificação por ponte do Solexa. De uma forma resumida, os fragmentos de DNA ligados a adaptadores gerados na construção da biblioteca são desnaturados, e as fitas simples são introduzidas numa *flow cell* que possui adaptadores imobilizados complementares aos presentes nos fragmentos de DNA. A amplificação por ponte permite que dentro da *flow cell* sejam formados diminutos *clusters* compostos por milhares de cópias clonais de um mesmo fragmento. Estas cópias são então desnaturadas e sequenciadas pelo método de terminação de cadeia, contendo dideoxynucleotídeos marcados por diferentes fluoróforos (BENTLEY et al., 2008; LIU et al., 2012).

Esta tecnologia apresenta uma das mais baixas taxas de erro e um dos maiores *throughput* por *read* (LOMAN et al., 2012), além de um dos menores preços por

base sequenciada do mercado – 0,50 dólares por base em 2012 (QUAIL et al., 2012), tornando-se a tecnologia de escolha para a maioria dos trabalhos atuais, e também a do presente trabalho.

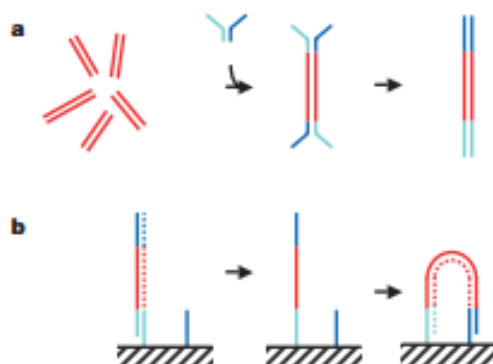


Figura 1 – Amplificação por ponte. a) O material genético que compõe a amostra é fragmentado e são ligados adaptadores às extremidades de cada fragmento. b) Estes fragmentos são desnaturados e introduzidos em uma *flow cell*, onde encontrarão adaptadores homólogos fixados a um suporte sólido. O fragmento de DNA irá se ligar a um dos adaptadores, posteriormente ligando-se também a outro, formando uma ponte. Ocorrerá então a cópia do fragmento por PCR, usando os adaptadores como iniciadores. Adaptado de Bentley et al., 2008.

1.4.3 Os estudos de metagenômica em bovinos

Recentemente o gado bovino também entrou na era da metagenômica e muitos autores dedicaram-se a pesquisar a microbiota destes animais. Neste primeiro momento, o trato gastrointestinal (TGI) tem recebido muita atenção, especialmente o rúmen, por conter uma microbiota muito específica e característica, capaz de desempenhar funções de grande interesse industrial – como a quebra da celulose – e que há muito vem sendo estudada por microbiologistas (GALBRAITH; ANTONOPOULOS; WHITE, 2004).

A análise de DNA realizada por Galbraith e colaboradores (GALBRAITH; ANTONOPOULOS; WHITE, 2004), isolou do rúmen 96 porções gênicas, sendo 81 de genes não conhecidos. Destas 96, 32,1% estavam relacionadas a bactérias, 18,5% a arqueias, 1,2% a eucariotos e 48,1% não puderam ser relacionadas a nenhum organismo. A pesquisa de mRNAs no rúmen de bovinos por McGrath e colaboradores (MCGRATH et al., 2008) também revelou uma maioria de procariotos (mais de 60%) neste órgão, sendo a grande maioria de

genes também desconhecidos. Já a pesquisa de DNA em fezes bovinas, por Shanks e colaboradores (SHANKS et al., 2006) encontrou apenas um valor de 32,6% de DNAs sem similaridade com sequências conhecidas.

Como os citados acima, outros trabalhos e revisões recentes tiveram como foco a metagenômica do TGI de bovinos (BRULC et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2013; KO et al., 2013; MATH et al., 2010; MCCANN; LOOR; WICKERSHAM, 2014; PATEL et al., 2014; SINGH et al., 2008), e também a investigação de quadros clínicos (BOUZALAS et al., 2014; HAUSE et al., 2015; KNUDSEN et al., 2015; KRULL et al., 2014; LI et al., 2013; NG et al., 2015), enquanto outras áreas também importantes, como o TGU, foram negligenciadas, não existindo, até o momento, trabalho publicado neste assunto.

1.5 Probiótico

Havenaar e colaboradores (1992) e Tannock (1999), citados por Otero e colaboradores (OTERO et al., 2000), definiram probióticos como microrganismos vivos administrados ao hospedeiro para potencializar as propriedades da microbiota indígena. Contudo, a definição mais recente e mundialmente aceita é da FAO/WHO (2002) que define probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro.

Certas características devem ser observadas para considerar uma bactéria como um potencial probiótico. Elas devem ser preferencialmente nativas e exibir propriedades como adesão ao epitélio e formação de biofilme nas superfícies mucosas. Essas propriedades previnem a adesão de patógenos bacterianos e podem conferir aos probióticos a capacidade de colonização e estabelecimento no hospedeiro (KLEESSEN; BLAUT, 2005). Atividade antimicrobiana devido à produção de bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio ou outros compostos também é desejável em microrganismos selecionados para estes fins. Além disso, a administração do probiótico deve ser segura, de forma que eles não devam apresentar patogenicidade potencial (REID, 1999). Um fator importante a ser considerado é que as amostras devem ser isoladas preferencialmente do mesmo animal hospedeiro, no qual as mesmas serão

aplicadas e da mesma região anatômica, baseado nas características de especificidade ao hospedeiro exercidas pelas espécies da microbiota indígena a ser colonizada (KOTARSKI; SAVAGE, 1979).

1.5.1 Probióticos para vacas

Alguns autores já descreveram os benefícios dos probióticos em bovinos, tanto em animais leiteiros (NOCEK; KAUTZ, 2006; STEIN et al., 2006), quanto de corte (BRASHEARS et al., 2003; YOUNTS-DAHL et al., 2005). Todavia, estes produtos são voltados para aumento da produtividade, e, até o presente momento, não existe um probiótico voltado para a sanidade do trato reprodutivo destes animais. Algumas tentativas já feitas: Kummer e colaboradores (KUMMER et al., 1997) demonstraram que a inoculação intra-uterina de bactérias do gênero *Lactobacillus* em vacas foi capaz de estimular as células do sistema imune, e probióticos poderiam ser utilizados pela via intra-vaginal em vacas para prevenir infecções e restaurar um equilíbrio ecológico afetado (OTERO et al., 2000).

Otero e colaboradores (OTERO; NADER-MACÍAS, 2006) verificaram as propriedades benéficas de algumas amostras de bactérias ácido-láticas (BAL) pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, isoladas da vagina de vacas, que poderiam ser utilizadas como probióticos. Um número elevado de amostras inibiu *E. coli* 99/14 (patógeno isolado de vagina de vacas com metrite). Essa inibição foi atribuída à produção de ácido. Poucas amostras inibiram *Actinomyces pyogenes* 96/393 (patógeno isolado da vagina de vacas com metrite). Essa inibição permaneceu após a neutralização, indicando o provável envolvimento de compostos como peróxido de hidrogênio ou bacteriocina, além de ácido.

Rodríguez e colaboradores (RODRÍGUEZ et al., 2011) observaram que 13 (45%) das 29 amostras de BAL isoladas de vagina de vacas foram positivas para a produção de peróxido de hidrogênio. A maioria dessas amostras (69%) apresentou baixa hidrofobicidade; três apresentaram alta hidrofobicidade – portanto, grande capacidade de adesão, característica importante para um

potencial probiótico, conforme citado anteriormente - todas elas pertencentes à espécie *Lactobacillus plantarum*.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

O rebanho bovino hoje no mundo apresenta números expressivos, cerca de um bilhão de cabeças, e também grande importância econômica. No Brasil, parte significativa do PIB nacional está relacionada à pecuária, e muitos empregos e outros benefícios indiretos são gerados por essa atividade, ressaltando a importância do gado bovino no país.

A metagenômica é uma área em franco desenvolvimento e difusão no meio científico, pois permite o estudo de microbiomas e de genes e subprodutos microbiológicos de interesse industrial antes nunca explorados, devido às limitações das técnicas de cultivo disponíveis. As pesquisas em metagenômica no gado bovino na década passada se limitaram ao TGI, de grande importância na microbiologia, mas outros campos igualmente importantes se encontram ainda inexplorados. Dentre estes, evidencia-se o trato vaginal.

Muitas patologias estão associadas ao trato geniturinário, podendo o comprometimento deste sistema levar o gado à infertilidade temporária ou permanente, tanto em macho como em fêmea. Muitos destes agentes podem contaminar inclusive o sêmen, colocando em risco o gado inseminado. Alguns trabalhos demonstram a diferença nos quadros de infertilidade em vacas nulíparas e múltiparas, tornando esta uma importante análise a ser realizada.

Estudos da microbiota vaginal em humanos já caracterizaram e demonstraram a importância destes microrganismos para a manutenção do estado saudável do trato, contribuindo com as defesas do hospedeiro contra a infecção por microrganismos potencialmente patogênicos, por diferentes estratégias, como competição e produção de substâncias tóxicas, entre outras. Entretanto, nenhum estudo desta natureza foi conduzido, até o presente momento, tendo os bovinos como espécie alvo.

Dentre os microrganismos encontrados no trato vaginal bovino como componentes da microbiota indígena, a identificação de amostras com potencial probiótico para utilização nesse mesmo sítio, com fins preventivos e curativos, atende à demanda atual para o desenvolvimento de novas estratégias para o

controle de microrganismos patogênicos. Dessa forma, o uso de substâncias antimicrobianas poderia ser reduzido ou até evitado nos sistemas de criação de bovinos. As substâncias antimicrobianas convencionalmente utilizadas são excretadas no leite e não contribuem para a melhoria da fertilidade dos animais. Além disso, o uso indiscriminado das mesmas pode acarretar a seleção de microrganismos resistentes. Por sua vez, o uso de probióticos promove efeitos benéficos para o hospedeiro, como imunomodulação, aumento na taxa de crescimento, inibição do crescimento de microrganismos patogênicos e favorecimento do equilíbrio da microbiota do trato vaginal.

Tendo em vista a importância do gado bovino no Brasil e no mundo, e a relevância dos estudos do trato vaginal destes animais, este trabalho objetivou uma análise metagenômica, para investigação da microbiota encontrada neste microbioma, especificamente nos gados Nelore, principal raça de corte no país, e também a mais numerosa.

Para este fim, dentre os métodos disponíveis, a plataforma de sequenciamento MiSeq se mostra de grande valor, por apresentar grande velocidade na obtenção de novas sequências e boa relação de custo/benefício, sendo esta, então, a plataforma de escolha deste trabalho. Em paralelo aos estudos genômicos, a análise dos microrganismos cultiváveis foi conduzida, de modo a tentar selecionar uma espécie que apresente todos os requisitos de um potencial probiótico, visando disponibilizar assim um candidato para indústrias nacionais interessadas nessa aplicação.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar e caracterizar a microbiota do trato vaginal do gado bovino da raça Nelore, comparando também o perfil microbiológico de novilhas e vacas adultas, prenhes e vazias, identificando, se possível, um candidato a probiótico.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar uma metodologia de coleta de lavado vaginal bovino e extração do ácido nucléico, assim como de coleta dos microrganismos cultiváveis.
- Gerar bibliotecas de material genético dos microrganismos coletados com qualidade para sequenciamento metagenômico.
- Sequenciar as bibliotecas montadas, utilizando o sistema MiSeq e analisar as amostras com o uso da bioinformática, relacionando os dados obtidos com os bancos de dados internacionais, e, quando possível, classificando os organismos.
- Associar e comparar os achados obtidos entre os grupos trabalhados, traçando um perfil da microbiota total do trato geniturinário de fêmeas bovinas da raça Nelore.
- Enumerar, isolar e identificar, por métodos de microbiologia clássica e biologia molecular, os componentes bacterianos cultiváveis da microbiota dominante do trato geniturinário de fêmeas bovinas.
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade probiótica das amostras isoladas da microbiota do trato geniturinário de fêmeas bovinas (produção de substâncias antagonistas, co-agregação e hidrofobicidade).

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Escolha da fazenda e coleta das amostras

Para a realização deste trabalho, foi selecionado um rebanho de elite, localizado em uma fazenda particular com sede em Matozinhos – MG. Visando a caracterização da microbiota normal e sadia do trato vaginal, foram estabelecidos alguns requisitos para a seleção dos animais envolvidos neste trabalho, todos atendidos pelo rebanho em questão: animais da raça Nelore, puros de origem, sob rigoroso controle sanitário, com reprodução por inseminação artificial e nenhum quadro clínico nos últimos 12 meses.

Dentro desse rebanho, 20 animais foram selecionados, divididos igualmente em quatro grupos: Novilhas Vazias (NV), Novilhas Prenhes (NP), Vacas Vazias (VV) e Vacas Prenhes (VP). A coleta ocorreu no mês de Maio de 2013, estando os animais prenhes no primeiro terço da gestação.

Todos os procedimentos de coleta e transporte foram realizados conforme descrito por Pellegrin e colaboradores (PELLEGRIN et al., 2003), sendo realizado o lavado cérvico-vaginal nas fêmeas. Todas as amostras foram mantidas a 4°C, e o transporte e processamento rápido das amostras foi priorizado.

A metodologia empregada neste trabalho foi analisada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA – UFMG), sob o número de protocolo 95/2012.

4.1.1 Lavado cérvico-vaginal

Inicialmente a região da vulva foi lavada com água destilada, e em seguida, a assepsia foi feita com o uso de álcool 70%. Cinquenta mililitros de solução salina (NaCl 0,9% em H₂O) estéril foram introduzidos na cavidade vaginal de cada animal, com o uso de uma seringa e uma sonda estéreis, de modo a impedir qualquer contato com o ambiente externo à cavidade vaginal (Figura 2). O líquido foi despejado de forma a lavar todo o interior da cavidade, sendo posteriormente

aspirado pela mesma sonda. Uma vez coletado, cada lavado foi transferido individualmente para tubos de 50 ml, lacrado, e mantido a 4°C. A seringa e a sonda foram descartadas ao final da coleta de cada animal.



Figura 2 - Lavado vaginal sendo realizado

4.2 Análise metagenômica dos lavados

4.2.1 Extração dos ácidos nucléicos genômicos de cada lavado

As amostras, imediatamente ao serem recebidas no laboratório, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização, para redução de seu volume. Uma vez liofilizadas, cada amostra foi reidratada num volume não superior a 5 ml.

Foi utilizado o kit *DNeasy Blood & Cell Culture DNA Midi Kit* (Qiagen, Venlo, Holanda) para extração do DNA genômico total, e todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante, brevemente: as amostras receberam um volume de tampão C1 e três volumes de água destilada, foram homogeneizadas por inversão, incubadas em gelo por 10 minutos e então centrifugadas por 15 minutos a 4°C e 1300g. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado suspenso em 1 ml de tampão C1 e 3 ml de água destilada. Os tubos foram

vortexados e centrifugados por 15 minutos a 4°C e 1300g, sendo o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi suspenso em 5 ml de tampão G2 e vortexado novamente. Foram adicionados 95 µl de Proteinase K, e a suspensão foi incubada por 1 hora a 50°C. Após a incubação, as amostras foram vortexadas e transferidas para colunas previamente equilibradas, para penetrarem uma camada de resina por gravidade. A resina foi lavada duas vezes com 7,5 ml de tampão QC, e as amostras foram eluídas em 5 ml de tampão QF a 50°C.

4.2.2 Precipitação do ácido nucléico extraído

Uma vez extraídos, os DNAs foram submetidos a precipitação para redução do volume eluído e concentração das amostras. Aos eluatos foram adicionados 250% v/v de etanol absoluto e 10% v/v de acetato de sódio 3M. Seguiu-se uma incubação de 16-18h a -20°C e centrifugação a 15000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso num volume de 100 µl de água livre de nucleases. A suspensão foi dosada por espectrofotometria (Nanovue, GE, Fairfield, EUA) para obtenção de uma estimativa da concentração e da qualidade de cada amostra, expressas em ng por µl e pela relação absorbância a 260nm / absorbância a 280nm, respectivamente.

4.2.3 Amplificação e purificação do DNA para sequenciamento metagenômico

Uma vez concentrado o DNA genômico extraído, cada lavado foi amplificado utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3. As reações foram realizadas nas condições que se seguem. Bactérias: Foram realizadas reações contendo 10 pmol de cada iniciador, 4 µl de tampão 5x (Promega, Fitchburg, EUA), 1 U GoTaq (Promega), 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 20 ng de DNA molde e H₂O livre de nucleases até um volume final de 20 µl, realizando um ciclo de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e finalmente 72°C por 7 minutos; Arqueias: 25 pmol de cada iniciador, 45 µl de *Taq Platinum Supermix* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EUA), 80ng de DNA molde e H₂O livre de nucleases até um volume final de 50 µl. A

mistura final continha 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP e 1 U de Taq Platinum. A sequência de ciclos realizada foi 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, e finalmente 72°C por 10 minutos; Fungos: 10 pmol de cada iniciador, 12,5 µl de 2x *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 40 ng de DNA molde e H₂O livre de nucleases até um volume final de 25µl. A mistura final continha 1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de dNTP. A quantidade de enzima presente na mistura não é revelada pela empresa. A sequência de ciclos consistiu em 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 54°C por 25 segundos e 72°C por 20 segundos, e finalmente 72°C por 10 minutos.

Iniciadores utilizados nas reações de PCR			
Organismo	Bactérias	Arqueias	Fungos
Região	16S rRNA	16S rRNA	LSU rRNA
	V5 - V6		D1/D2
Referência	Andersson <i>et al.</i> , 2008	Faveri <i>et al.</i> , 2011	Kwiatkowski <i>et al.</i> , 2012
Iniciador Senso	784F: AGG ATT AGA TAC CCT GGT A	300fEyAr: AGC RRG AGC CCG GAG ATG G	NL1: GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
Iniciador Antissenso	1061R: CRR CAC GAG CTG ACG AC	954rEyAr: CGG CGT TGA RTC CAA TTA AAC	NL4: GGT CCG TGT TTC AAG ACG G
Tamanho Esperado	~280pb	~500-600pb	~400-1000pb

Tabela 3 – Iniciadores universais utilizados nas reações de PCR.

Todos os DNAs extraídos dos animais coletados foram submetidos a essas três reações. Em seguida, os produtos de PCR foram precipitados e suspensos em 22 µl de água livre de nucleases, de acordo com o protocolo descrito no item 4.2.2 e uma alíquota de 2 µl de cada reação foi analisada em gel de agarose, para confirmação da amplificação e estimativa da concentração de material genético presente na amostra.

Em seguida, foram construídos *pools* de *amplicons* de fungos e arqueias para cada animal, resultando em um tubo de *amplicons* de bactérias, e outro de *amplicons* de fungos e arqueias, para cada animal. Tal separação se fez necessária devido à diferença nos tamanhos dos *amplicons*, que gerou a necessidade de construir bibliotecas diferentes para tamanhos muito diferentes,

de modo a potencializar os resultados do sequenciamento. Seguiu-se então a construção das bibliotecas e o sequenciamento metagenômico.

4.2.4 Construção das bibliotecas e sequenciamento metagenômico

As bibliotecas do tipo *paired-ends* foram construídas a partir de 50 ng de DNA. Devido à diferença de tamanho entre os *amplicons* dos três grupos biológicos trabalhados, duas estratégias diferentes foram utilizadas. Para bactérias, cujos *amplicons* apresentavam menos de 300pb, os fragmentos de DNA foram ligados diretamente a adaptadores específicos, utilizando o kit *TruSeq Nano DNA Library Preparation Kit* (Illumina, San Diego, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foram purificados e submetidos a uma reação de amplificação utilizando iniciadores complementares aos adaptadores. Os produtos foram quantificados através de PCR em tempo real, utilizando o kit *Sybr Fast qPCR Kit* (Kapa Biosystems, Wilmington, EUA). As bibliotecas foram então diluídas em solução de Tris-HCl e Tween 0,1%, depositadas em uma *flow cell* e submetidas a 600 ciclos (2x300bp) de sequenciamento utilizando o *MiSeq Reagent Kit v3* (Illumina).

Para os *pools* de arqueias e fungos foi realizada uma construção semelhante, porém, como os *amplicons* chegavam a 1000pb, as amostras foram submetidas a uma fragmentação aleatória, na qual os *amplicons* foram simultaneamente fragmentados e ligados a adaptadores específicos, utilizando o kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina), conforme instruções do fabricante. Os procedimentos de amplificação, quantificação e sequenciamento dessas bibliotecas foram os mesmos descritos acima, para as bibliotecas de bactérias.

Estes procedimentos resultaram na construção e sequenciamento de duas bibliotecas por animal, uma tendo como alvo as bactérias, e a outra arqueias e fungos. Para que fossem realizados apenas dois sequenciamentos, um para bactérias e outro para arqueias e fungos, cada animal foi marcado com um índice diferente, utilizando o kit *Nextera XT Index Kit (24 indices, 96 samples)* (Illumina), seguindo as instruções do fabricante. Deste modo, foi possível sequenciar todos os 20 animais em uma mesma *flow cell* em cada uma das reações, e posteriormente separá-los de acordo com os índices das sequências.

4.2.5 Tratamento e análise dos dados obtidos

As bibliotecas, obtidas no modelo *paired-ends*, foram submetidas ao servidor MG-RAST (MEYER et al., 2008), onde os pares de bibliotecas foram unidos, juntando-se as sequências com base na similaridade entre diferentes extremidades de uma mesma sequência original. Os fragmentos que não apresentaram similaridade com as sequências de seu arquivo par de sua biblioteca foram excluídos das análises subsequentes. Em seguida, as bibliotecas unificadas foram submetidas ao *pipeline* do servidor, ativadas as seguintes opções: *dereplication*, para remover das amostras as replicatas artificiais, produzidas por técnicas de amplificação e sequenciamento; *screening*, para remoção das sequências pertencentes a *Bos taurus*; *Dynamic trimming*, para remoção de sequências de baixa qualidade, exigindo um *score phred* mínimo de 15 para bases de alta qualidade, e um máximo de 5 bases de qualidade inferior a este *score* por fragmento.

As bibliotecas de alta qualidade, resultantes desse processamento, foram utilizadas nas análises subsequentes, exigindo-se sempre 98% de identidade mínima, alinhamento mínimo de 100pb e E-valor máximo de 10^{-8} , sendo este o critério para a identificação de uma OTU (Unidade Taxonômica Operacional) neste trabalho. A base de dados M5RNA (que engloba as bases de dados Silva, Greengenes e *Ribosome Database Project*, RDP) foi utilizada para comparação das anotações, sendo a base indicada para a análise de várias sequências de rRNA. Para a construção dos gráficos, foi excluído um máximo de um valor por grupo quando este se apresentava muito discrepante da média, de modo a tentar reduzir a influência da variabilidade individual e de valores extremos na compreensão de cada grupo, possibilitando-se assim um panorama mais realista de sua composição normal. Estas sequências foram utilizadas para a construção de gráficos evidenciando a curva de rarefação das amostras, a alfa diversidade, bem como a análise da composição da microbiota (bactérias, arqueias e fungos).

4.3 Isolamento, caracterização morfo-tintorial e identificação dos microrganismos isolados do trato geniturinário de fêmeas bovinas

4.3.1 Isolamento

Na chegada ao laboratório, as amostras foram introduzidas imediatamente numa câmara anaeróbia (Forma Scientific Inc., Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂. Antes da introdução na câmara anaeróbica, uma alíquota do lavado vaginal foi utilizada para confecção de lâmina que, posteriormente, foi corada pelo método de Gram. Essa operação teve o objetivo de permitir a estimativa dos níveis populacionais e os tipos de bactérias presentes no fluido bruto bem como avaliar se essas informações concordarão com os dados obtidos posteriormente na enumeração, isolamento e identificação dos diferentes grupos bacterianos antes do uso para a realização das análises microbiológicas.

A partir do lavado vaginal introduzido na câmara, diluições decimais seriadas foram preparadas com solução salina estéril. Uma alíquota de 0,1 ml das diluições 10⁰ e 10⁻² foi semeada com auxílio de esferas de vidro, em placas de Petri contendo Ágar Sangue (AS) e Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Alemanha). A incubação total foi de uma semana a 37°C em câmara anaeróbia, com leituras intermediárias. Também foram semeadas em aerobiose com 0,1 ml das mesmas diluições placas de Petri contendo AS, Ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, EUA) e Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck). As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas.

Os dados foram representados em log₁₀ UFC por ml de lavado. Observando-se macroscopicamente as características morfológicas, duas colônias de cada tipo diferente foram isoladas e semeadas em meio de cultura para obtenção de culturas puras.

4.3.2 Manutenção e conservação das amostras isoladas

As amostras isoladas foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia) e congeladas em freezer, a -20°C com 20% de glicerol.

4.3.3 Caracterização presuntiva dos isolados

Após o crescimento e obtenção de culturas puras, foram observadas as características morfo-tintoriais das amostras pelo método de coloração de Gram, para análises presuntivas dos isolados.

4.3.4 Identificação

As bactérias isoladas foram submetidas a identificação molecular por sequenciamento. Uma porção da região 16S do rRNA foi amplificada por PCR e posteriormente sequenciada.

4.3.4.1 Extração do DNA para sequenciamento tradicional

As bactérias foram crescidas em alíquotas de 1 ml, em caldo BHI, e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após a incubação, foram submetidas à centrifugação a 2500g, por 4 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a fração líquida foi descartada e o precipitado lavado com 100 µl de solução de Tris-EDTA (TE). Este mesmo procedimento de centrifugação e lavagem foi repetido por três vezes. Os tubos contendo as bactérias foram então incubados a 100°C, por 10 minutos. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 9000g, por 30 segundos, à temperatura ambiente. A fração líquida, contendo o DNA bacteriano, foi coletada, e o precipitado descartado.

4.3.4.2 Amplificação e purificação da região 16S do rRNA

Para amplificação da região 16S do rRNA bacteriano, foi selecionado um par de iniciadores que abrangem as regiões V5 e V6, extremamente variável (Tabela 3). A reação de PCR e sua sequência de ciclos estão descritas na seção 4.2.3.

4.3.4.3 Sequenciamento tradicional

O sequenciamento foi realizado utilizando os mesmos iniciadores descritos no item anterior, de acordo com o seguinte protocolo: uma mistura contendo 40 ng

de DNA, 0,5 µl de *BigDye Terminator Sequencing Mix 2,5x* (Thermo Fischer Scientific), 1,75 µl de *BigDye Sequencing Buffer 5x* (Thermo Fischer Scientific), 10 pmol de cada iniciador e água livre de nucleases até um volume final de 10 µl foi submetida à seguinte sequência de ciclos: 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 53°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a precipitação das reações com etanol e acetato de sódio, de forma similar ao que foi descrito no item 4.2.2, foram adicionados 15 µl de formamida Hi-Di (Thermo Fischer Scientific) a cada amostra, e o sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI (Thermo Fischer Scientific).

4.4 Pesquisa do potencial probiótico de microrganismos isolados do trato geniturinário de fêmeas bovinas

4.4.1 Ensaio de antagonismo *in vitro*

As bactérias isoladas foram submetidas ao ensaio de antagonismo *in vitro*, utilizando as seguintes cinco bactérias como reveladores, todas isoladas de casos clínicos observados em bovinos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus* sp. e dois *Streptococcus* sp., identificados como 1 e 2, gentilmente cedidas pelo professor Rômulo Cerqueira Leite, da Escola de Veterinária da UFMG.

Utilizando um replicador de *Steers*, as bactérias isoladas foram colocadas em placas de Petri contendo Ágar BHI (Acumedia) ou MRS (Merck), e incubadas em aerobiose por 48 horas, a 37°C. Após a incubação, as placas foram colocadas em posição invertida e em cada tampa foram colocados 500 µl de clorofórmio. Depois de 30 minutos, as placas de Petri foram entreabertas para permitir a evaporação do clorofórmio residual, e assim mantidas por mais 30 minutos. Uma sobrecamada de 3,5 ml de Ágar BHI semissólido (7,5%), acrescido de 10 µl de uma cultura microbiana patogênica reveladora cultivada por 24 horas, a 37°C, em caldo BHI, foi colocada sobre o ágar. Após nova incubação a 37°C por 24 horas, foi efetuada a leitura dos halos de inibição. O critério de determinação dos resultados foi a presença ou ausência do halo de inibição.

4.4.2 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio

Para testar a produção de peróxido de hidrogênio pelas amostras, foi realizado um teste semiquantitativo como descrito por Rabe e Hillier (RABE; HILLIER, 2003). As amostras foram cultivadas em meios específicos, por 18 horas, a 37°C, e semeadas em meio tetrametilbenzidina-plus (TMB; Sigma, Saint Louis, EUA), utilizando-se o replicador de *Steers*. Após incubação a 37°C, por 48 horas em anaerobiose, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e foram expostas ao oxigênio por cerca de 30 minutos. O aparecimento de uma coloração azul nas colônias indica teste positivo para a produção de peróxido de hidrogênio. Como controle positivo, foi utilizada uma amostra de *Lactobacillus* sabidamente positiva.

4.4.3 Teste de hidrofobicidade

Para testar o grau de hidrofobicidade das amostras, foi utilizado o método de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH), descrito por Rosenberg e colaboradores (ROSENBERG; JUDES; WEISS, 1983) e modificado por Geertsema-Doornbusch e colaboradores (GEERTSEMA-DOORNBUSCH; VAN DER MEI; BUSSCHER, 1993). Os *pellets* bacterianos foram lavados e suspensos em solução salina para obtenção de densidade óptica entre 0,4 a 0,6 em 600 nm. O solvente hidrofóbico xilol foi então adicionado a cada suspensão celular e a mistura vortexada vigorosamente por 1 minuto. Em seguida, as misturas foram mantidas em repouso para permitir que o solvente se separe da fase aquosa. A camada aquosa mais densa foi cuidadosamente removida usando pipetas de *Pasteur* e transferida para tubos limpos e a absorbância foi novamente medida. A porcentagem de hidrofobicidade foi obtida por meio do seguinte cálculo:

$$\% \text{ Hidrofobicidade} = [(DO_{\text{inicial}} - DO_{\text{final}}) / DO_{\text{final}}] \times 100$$

De acordo com as características hidrofóbicas da superfície das bactérias, as amostras são usualmente classificadas em três categorias: alta hidrofobicidade (71-100%), média (36 a 70%) e baixa (0 a 35%), e o critério de classificação das amostras seguiu esta mesma definição.

4.4.4 Teste de co-agregação com bactérias patogênicas

Um volume de 1 ml de uma suspensão em PBS contendo 10^8 UFC do isolado genital foi misturado durante 10 segundos em vortex com 1 ml de uma suspensão contendo 10^8 UFC de cada amostra patogênica indicadora utilizada no teste de antagonismo *in vitro* descrito no item 4.4.1. A seguir, a mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após este tempo, o fenômeno de agregação foi observado em microscópio após coloração de Gram. Um escala de 0 a 4 foi utilizada para avaliar a intensidade da agregação.

4.4.5 Análises estatísticas empregadas

Todos os testes estatísticos foram realizados por One-way ANOVA com pós teste de Tukey, com $p < 0,05$, no software GraphPad Prism 5.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta e agrupamento das amostras

De modo a facilitar as análises posteriores, os 20 animais foram nomeados de acordo com a Tabela 4.

Animal	Novilhas		Vacas	
	Vazias	Prenhes	Vazias	Prenhes
1	NV1	NP1	VV1	VP1
2	NV2	NP2	VV2	VP2
3	NV3	NP3	VV3	VP3
4	NV4	NP4	VV4	VP4
5	NV5	NP5	VV5	VP5

Tabela 4 – Identificação dos animais coletados

5.2 Análises metagenômicas

5.2.1 Análise da precipitação dos *amplicons* em gel de agarose

Os resultados, apresentados em três géis representativos de todas as amostras, podem ser observados na Figura 3.

De uma forma geral, os *amplicons* de bactérias foram bastante constantes em concentração, sendo possível amplificar bactérias em todas as amostras coletadas. Já para arqueias, houve variação entre as amostras, não sendo possível amplificar arqueias em alguns casos (NV1, NV3, NV4, NV5 e VV5). Também houve variação na amplificação dos fungos: embora todas as amostras amplificadas apresentassem um perfil de 3 bandas distinguíveis (~400 pb, ~650 pb e > 1000 pb), a intensidade de cada banda variou entre as amostras, e não houve amplificação em umas das amostras (NV1).

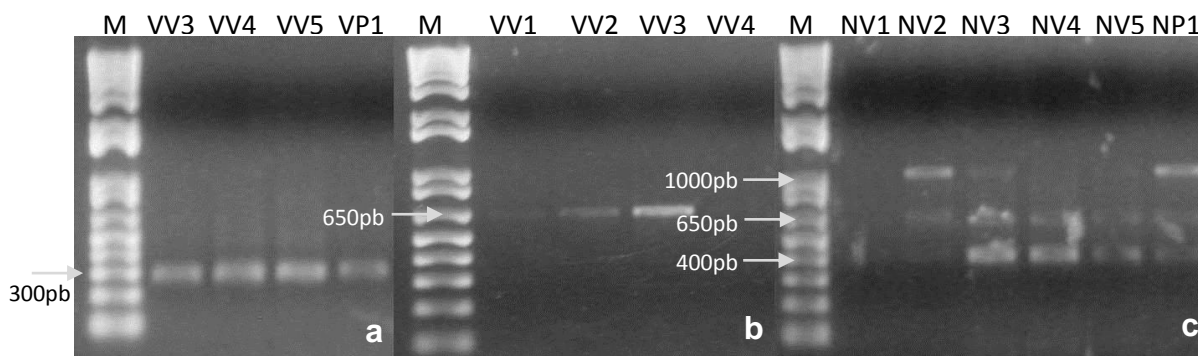


Figura 3 – Análise dos precipitados em gel de agarose. Foram aplicados 2 µl de cada precipitado de DNA reconstituído. As imagens acima são representativas de todos os animais. a – *Amplicons* de bactérias; b – *Amplicons* de arqueias; c – *Amplicons* de fungos. M – Marcador de tamanho molecular (1kb Plus - Thermo Fischer Scientific), VV – Vaca Vazia, VP – Vaca Prenhe, NV – Novilha Vazia, NP – Novilha Prenhe.

Estes resultados confirmaram a presença dos três grupos biológicos investigados em quase todas as amostras. Também foi possível observar uma variação significativa entre as amostras em relação à amplificação de arqueias e fungos. Notavelmente, para os animais vazios, em especial nas novilhas, houve maior dificuldade na amplificação destes grupos, principalmente para arqueias em novilhas vazias, onde só foi possível obter amplificação a partir de um animal.

5.2.2 Composição das bibliotecas, curvas de rarefação e diversidade alfa das amostras

Um total de 39 bibliotecas foram construídas a partir dos *amplicons* precipitados, sendo 20 bibliotecas bacterianas e 19 bibliotecas de arqueias e fungos. O resultado do tratamento das bibliotecas, indicado no item 4.2.5, pode ser visualizado na Tabela 5.

A curva de rarefação de cada biblioteca construída e sequenciada é apresentada na Figura 4. É possível observar que as amostras foram devidamente representadas, tendo todas as curvas alcançado um platô – o que significa que um aumento no número de *reads*, ou seja, de fragmentos de DNA, não leva mais a um aumento no número de espécies, indicando que o ambiente foi

Animal	Sequencias bacterianas					Sequencias arqueais/fúngicas				
	Sequencias totais	Replicatas artificiais removidas	Sequências filtradas pelo QC	Sequências aprovadas pelo QC	Comprimento médio das sequências	Sequencias totais	Replicatas artificiais removidas	Sequências filtradas pelo QC	Sequências aprovadas pelo QC	Comprimento médio das sequências
NV1	305058	215408	15002	74648	235 ± 67	-				
NV2	401399	303274	3985	94140	232 ± 68	106992	78215	9145	19632	246 ± 105
NV3	308810	190368	50737	67705	232 ± 71	300855	254898	7312	38645	208 ± 90
NV4	544504	435737	4324	104443	205 ± 68	239998	203150	7181	29667	194 ± 91
NV5	376581	240799	42492	93290	223 ± 72	44209	32137	2504	9568	227 ± 93
NP1	465055	364869	840	99346	234 ± 65	277130	231573	14406	31151	229 ± 101
NP2	368948	277755	6801	84392	238 ± 68	202971	155763	17913	29295	226 ± 101
NP3	251414	112481	76710	62223	228 ± 79	343260	252088	52808	38364	261 ± 110
NP4	326702	221385	22007	83310	225 ± 72	369559	300823	21041	47695	216 ± 99
NP5	446517	350657	1083	94777	240 ± 65	381001	298529	40912	41560	247 ± 114
VV1	565357	446515	1508	117334	232 ± 67	456323	356624	46052	53647	202 ± 95
VV2	371053	284135	10368	76550	240 ± 69	584183	487348	33313	63522	209 ± 96
VV3	283798	210737	512	72549	233 ± 69	466945	401023	10616	55306	210 ± 98
VV4	661416	530261	44830	86325	300 ± 92	303353	252321	28100	22932	264 ± 116
VV5	437093	341103	2957	93033	234 ± 69	485333	407732	26252	51349	197 ± 113
VP1	317322	235497	18777	63048	239 ± 66	631012	507182	63502	60328	155 ± 95
VP2	473479	358341	11731	103407	240 ± 65	471810	416762	19481	35567	257 ± 115
VP3	366743	312917	506	53320	229 ± 68	398153	307232	40614	50307	223 ± 104
VP4	322749	199497	60340	62912	255 ± 62	544704	411645	81153	51906	155 ± 94
VP5	360967	269778	7770	83419	227 ± 69	462356	339272	72564	50520	196 ± 109

Tabela 5 – Análise das bibliotecas geradas e do controle de qualidade (QC) das sequências. Os dados foram filtrados visando a eliminação de replicatas artificiais, sequências do hospedeiro (*Bos taurus*), e a presença de um máximo de cinco bases com escore inferior a 15 por sequência.

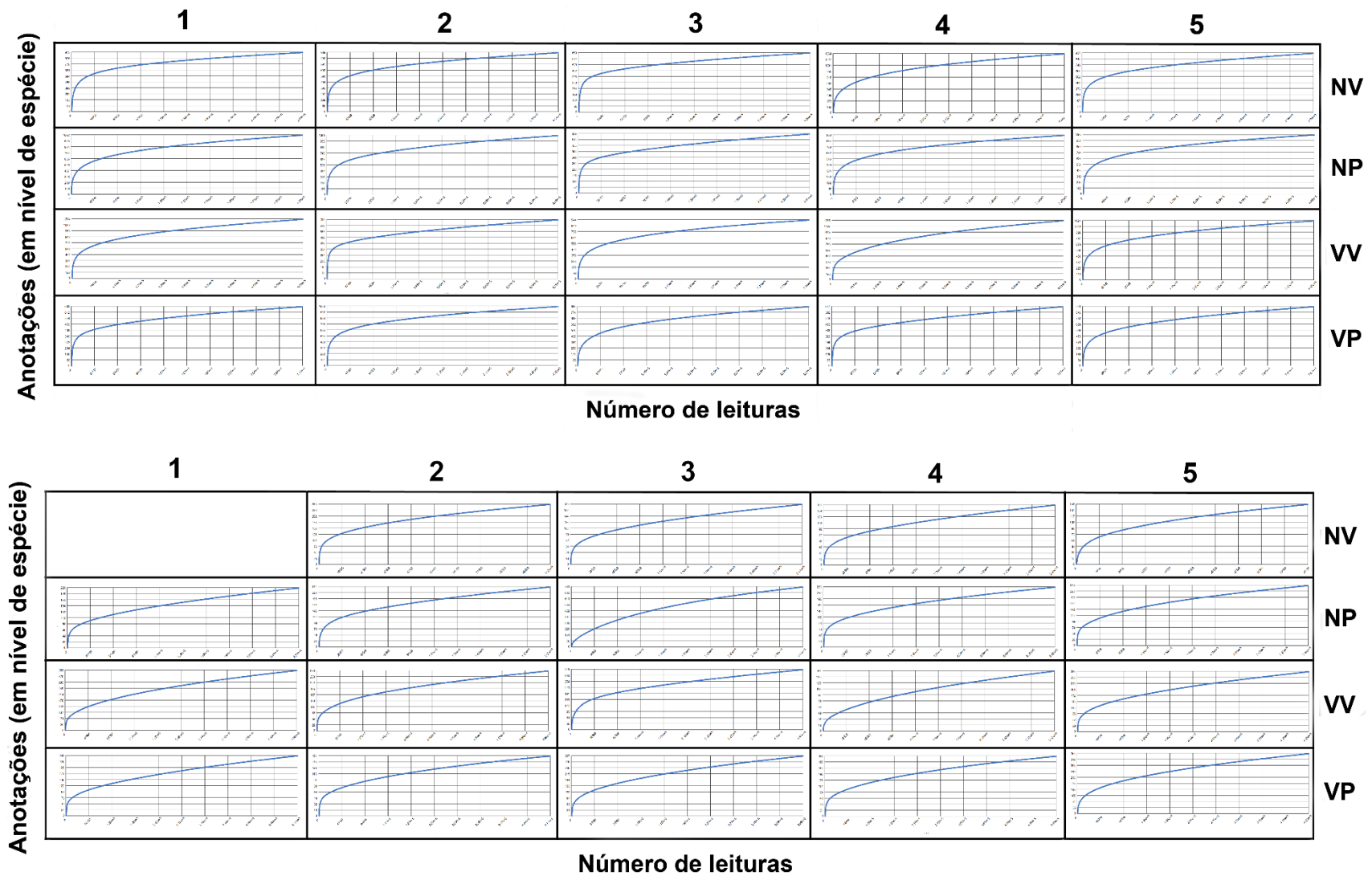


Figura 4 – Curvas de rarefação de todas as 20 bibliotecas bacterianas (acima) e 19 bibliotecas arqueais/fúngicas (abaixo) construídas e sequenciadas.

completamente explorado. Estes são dados importantes, pois significam que o ambiente foi explorado de forma satisfatória, levando em conta a diversidade de espécies presentes. Portanto, as análises realizadas a partir destas amostras representam um quadro bastante aproximado de todo o microbioma do trato vaginal bovino, e não apenas uma fração da microbiota presente. Deve-se considerar que todo trabalho que envolva PCR carrega um viés de amplificação de difícil quantificação, mas tendo em vista os iniciadores universais utilizados, e o quadro observado nas curvas de rarefação, pode-se inferir que os dados obtidos fornecem um panorama sobre a composição da microbiota dos animais.

A Figura 5 apresenta os índices de diversidade alfa das amostras, calculados automaticamente como o antilog do índice de Shannon pela plataforma MG-RAST. Este é um dado também importante, que leva em conta a quantidade de espécies encontradas e a abundância de cada uma, fornecendo em apenas um número uma estimativa da diversidade de cada amostra – comunidades dominadas por apenas poucas espécies tendem a apresentar um valor menor de diversidade alfa, enquanto comunidades sem tal dominância tendem a apresentar valores maiores. Os dados são apresentados como a média e o desvio padrão dos valores de cada grupo. É possível observar, na Figura 5, que existe uma tendência a uma menor diversidade alfa bacteriana nos animais prenhes em relação aos vazios, o que pode ser interpretado como uma tendência a uma redução do número de espécies bacterianas e/ou aumento da abundância de algumas poucas espécies em situações de prenhez. Em contrapartida, o inverso pode ser inferido para arqueias e fungos: há uma tendência de maior diversidade alfa durante a prenhez, o que significa maior número de espécies presentes e/ou menor dominância de algumas espécies.

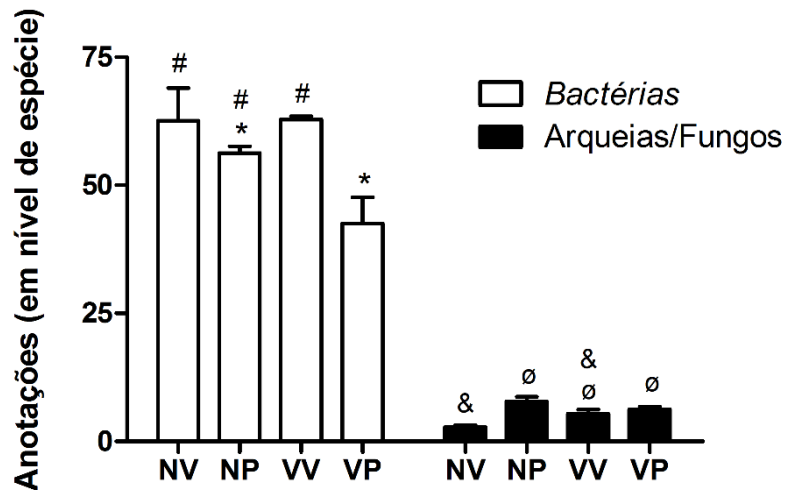


Figura 5 – Diversidade alfa média com desvio padrão dos grupos analisados, representada pelo antilog do index de Shannon. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2.3 Análise dos metagenomas

Utilizando a plataforma MG-RAST, com os parâmetros estabelecidos no item 4.2.4, os dados obtidos foram analisados em relação à composição das comunidades, sendo apresentados aqui os dados referentes aos domínios, filos e gêneros de bactérias, arqueias e fungos, representando as médias de cada grupo.

5.2.4 Análise dos domínios

Inicialmente, é notável a variabilidade dentro de cada grupo (NV, NP, VV e VP); os desvios encontrados nas análises estatísticas e apresentados no gráfico (Figura 6) indicam que, embora seja possível identificar diferentes tendências em cada grupo, em muitos casos os achados são comparáveis e/ou equivalentes estatisticamente, devido à ausência de uniformidade entre os indivíduos de um mesmo grupo. Esses dados apontam para um ambiente dinâmico, onde até os principais organismos (em termos de abundância) flutuam em relação a cada indivíduo. Teorias semelhantes já foram descritas por outros autores

(Ramaswamy *et al.* 1991 e Sharda *et al.*, 1991, *apud* SILVA *et al.*, 2011), e os achados do presente trabalho corroboram esta hipótese de forma inédita, investigando também os microrganismos não cultiváveis. Apenas para arqueias é possível constatar uma diferença significativa entre os grupos trabalhados, diferença esta que será abordada posteriormente neste trabalho.

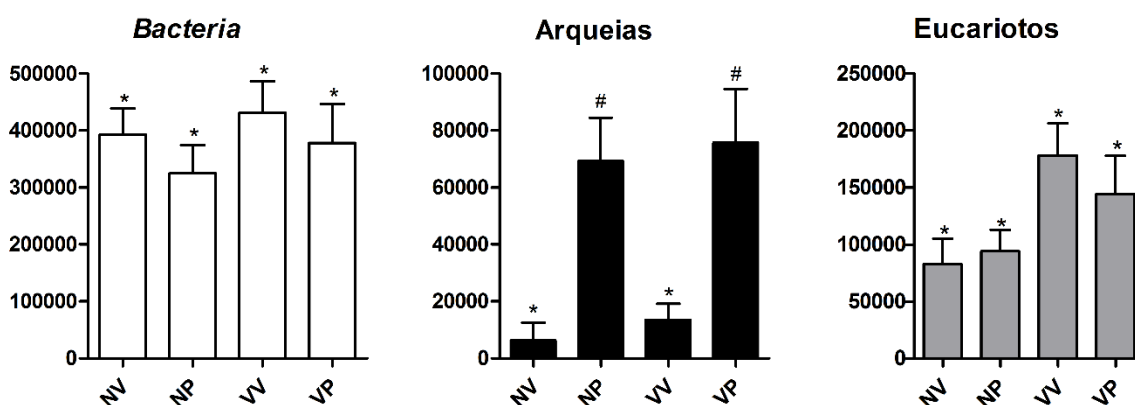


Figura 6 – Abundância dos domínios encontrados nas amostras, em número de leituras. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2.5 Bactérias

Dentre os principais domínios encontrados, um possível predomínio de *Bacteria* pode ser observado, com base no número de leituras observadas para este domínio (Figura 6). Esta predominância está em acordo com dados anteriores já conhecidos a respeito da microbiota vaginal de outros animais, como a mulher, a rata e a macaca (ANTONIO; HAWES; HILLIER, 1999; DUMONCEAUX *et al.*, 2009; HERTHELIUS *et al.*, 1989; REID *et al.*, 1985), e com as análises de diversidade já apresentadas (Figura 5). Ocorre também uma tendência de redução das quantidades de bactérias neste trato em situações de prenhez, em paralelo a um aumento da população de arqueias, o que também está de acordo com o observado na Figura 5. Uma possível explicação para este achado tem como base os trabalhos de Otero e colaboradores (OTERO *et al.*, 1999): estes autores descreveram a variação da população bacteriana cultivável ao longo do ciclo estral em vacas, encontrando uma tendência de redução da população

microbiana após o estro (fase marcada pela liberação de grandes quantidades de estrógeno) (Figura 7). Desta forma, no período de predomínio de liberação de progesterona, os animais tenderiam a apresentar uma microbiota bacteriana menos abundante. Sendo a progesterona o hormônio dominante durante a maior parte da gestação, a microbiota bacteriana vaginal poderia seguir este perfil, apresentando uma ligeira redução nas fêmeas prenhes. Este nicho vago poderia ser aproveitado pelas arqueias – uma vez que os metabolismos destes dois domínios são semelhantes (ZILLIG, 1991) – que se estabeleceriam no TGU neste intervalo. Após o parto, com o retorno aos níveis hormonais normais, a população microbiana voltaria ao equilíbrio anterior à prenhez, com a supressão de grande parte da população arqueal. Uma explicação alternativa menos provável pode ser obtida invertendo-se a causa: o aumento da população de arqueias, trazido pela prenhez (Figura 6), traria também um aumento na competição ecológica por recursos escassos, reduzindo a população bacteriana. Ou ainda: a população bacteriana poderia ser inibida pelas arqueias por meio de algum efeito antagonista. Dentre todas as alternativas, a primeira parece mais provável, mas a real causa desta variação permanece a ser definida.

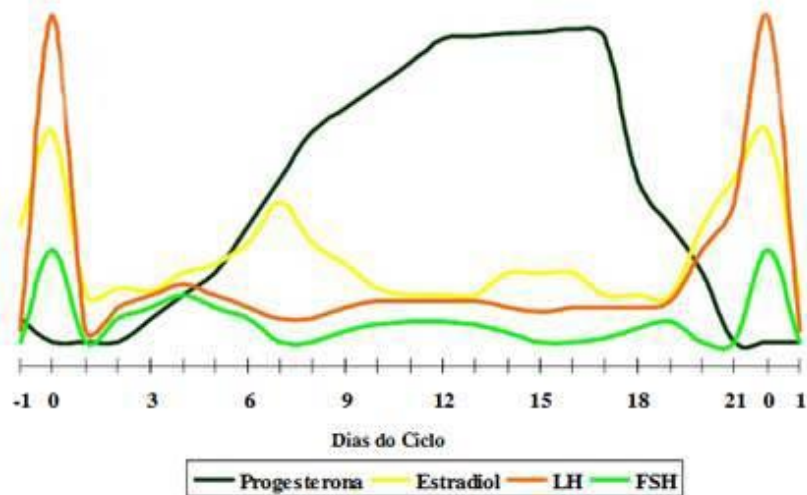


Figura 7 – Variação hormonal ao longo do ciclo estral das vacas. Adaptado de www.uff.br.

5.2.5.1 Filos bacterianos

Os filos de *Bacteria* encontrados estão listados na Figura 8. Os três filos mais abundantes no TGU das fêmeas Nelore são *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Malmuthuge e colaboradores (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2014) encontraram, por metagenômica, os mesmos três filos como dominantes na microbiota do TGI de bovinos desde três semanas de vida, dados corroborados pelos trabalhos de Ziemer (ZIEMER, 2014) e Kim e colaboradores (KIM et al., 2014), estudando culturas de fezes de animais jovens e adultos, também por metagenômica. Em todos os grupos analisados, *Firmicutes* aparece como o filo estatisticamente mais abundante ($p < 0,05$), exceto nas vacas prenhes – onde ele é o mais abundante, porém a diferença não é estatisticamente significativa. Vale ressaltar, todavia, que a abundância relativa das proteobactérias neste grupo apresentou uma variação muito alta, superior a 50% da média, dificultando o estabelecimento de uma tendência para este grupo.

5.2.5.2 Gêneros bacterianos e OTUs equivalentes

Numa análise mais fina, uma grande variedade de gêneros bacterianos parece colonizar a vagina destes animais (Figura 9). Os gêneros mais abundantes (*Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Rikenella*, *Alistipes*, *Bacillus*, *Eubacterium* e *Prevotella*) pertencem a três ordens diferentes - *Clostridiales*, *Bacillales* e *Bacteroidales* (Figura 10) - e representam apenas 30-40% do total de bactérias presentes nas amostras. Um total de 85 OTUs compõem aproximadamente 95% da amostra, sendo a maioria (69 OTUs) de abundância relativa média menor que 1%. Não há uma predominância significativa entre os gêneros, embora observada a tendência de *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus* serem mais abundantes em todos os quatros grupos estudados. De forma curiosa, não é possível relacionar a microbiota característica do trato vaginal à idade dos animais, nem à presença ou ausência de estado gestacional.

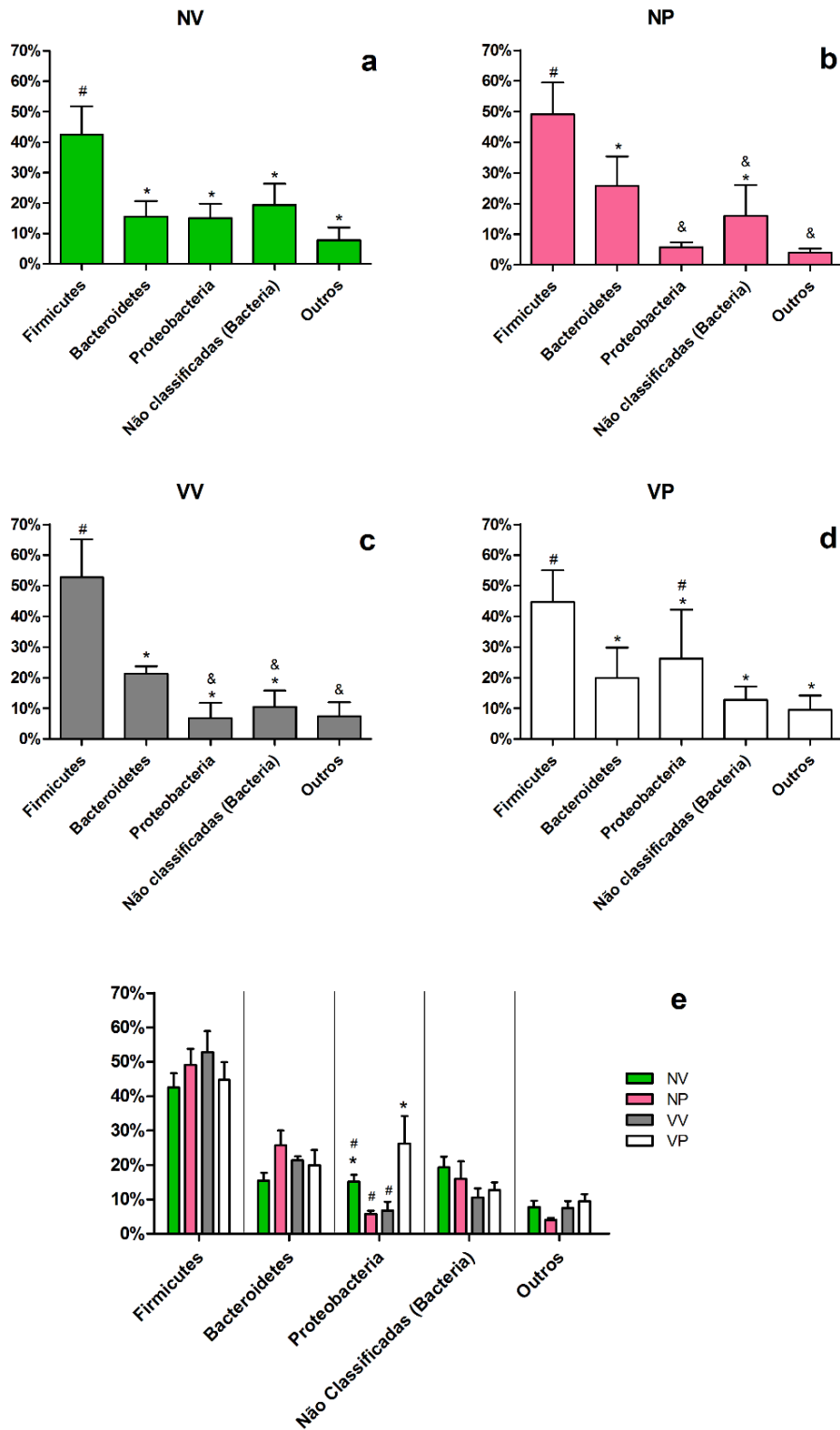


Figura 8 – Filos de *Bacteria*. (a-d) Abundância relativa dos filios em cada grupo. (e) Comparação entre a abundância de cada filo entre os grupos. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

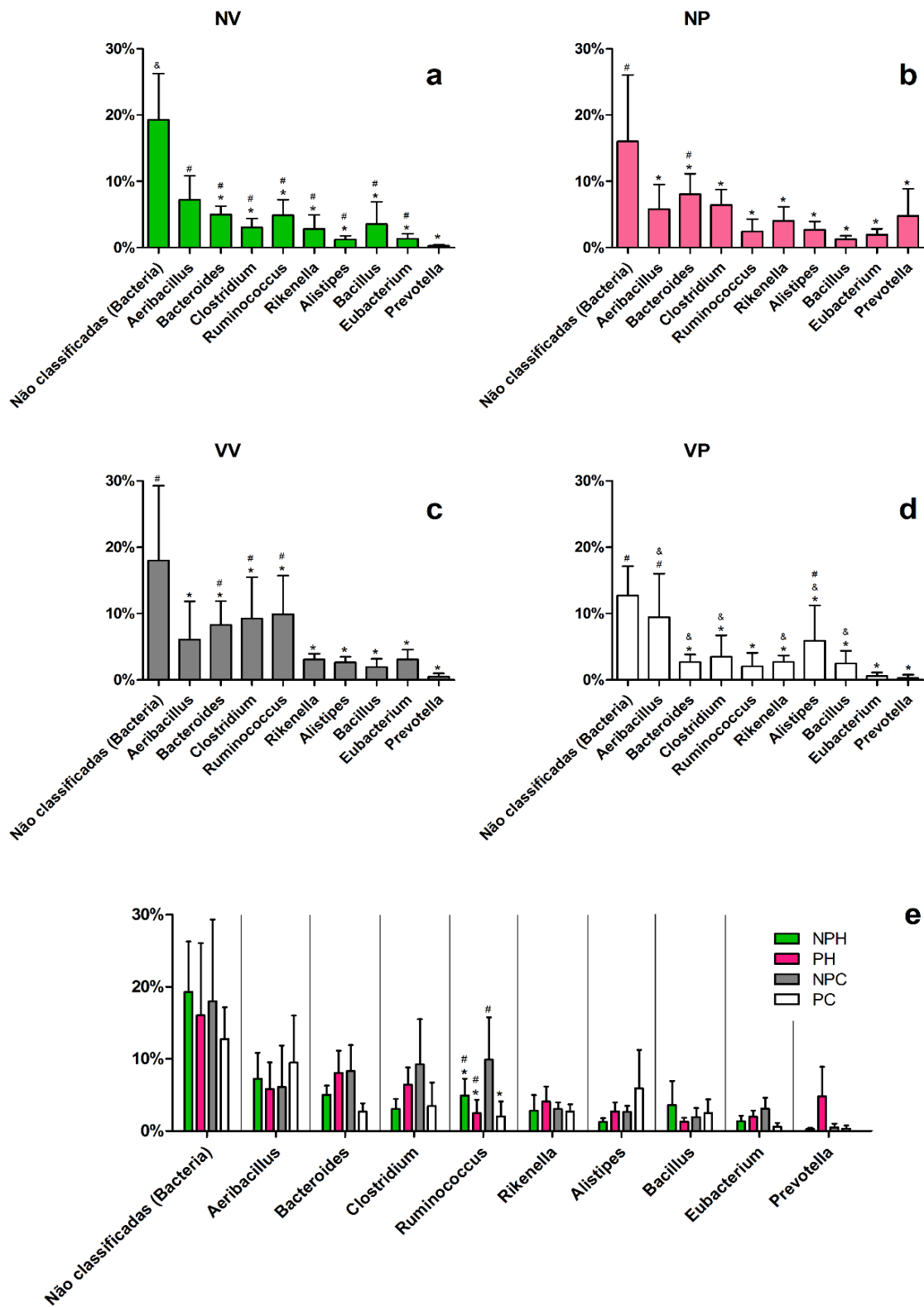


Figura 9 – OTUs mais abundantes de *Bacteria*, em nível de gênero. (a-d) Abundância relativa das OTUs em cada grupo. (e) Comparação entre a abundância de cada OTU entre os grupos. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

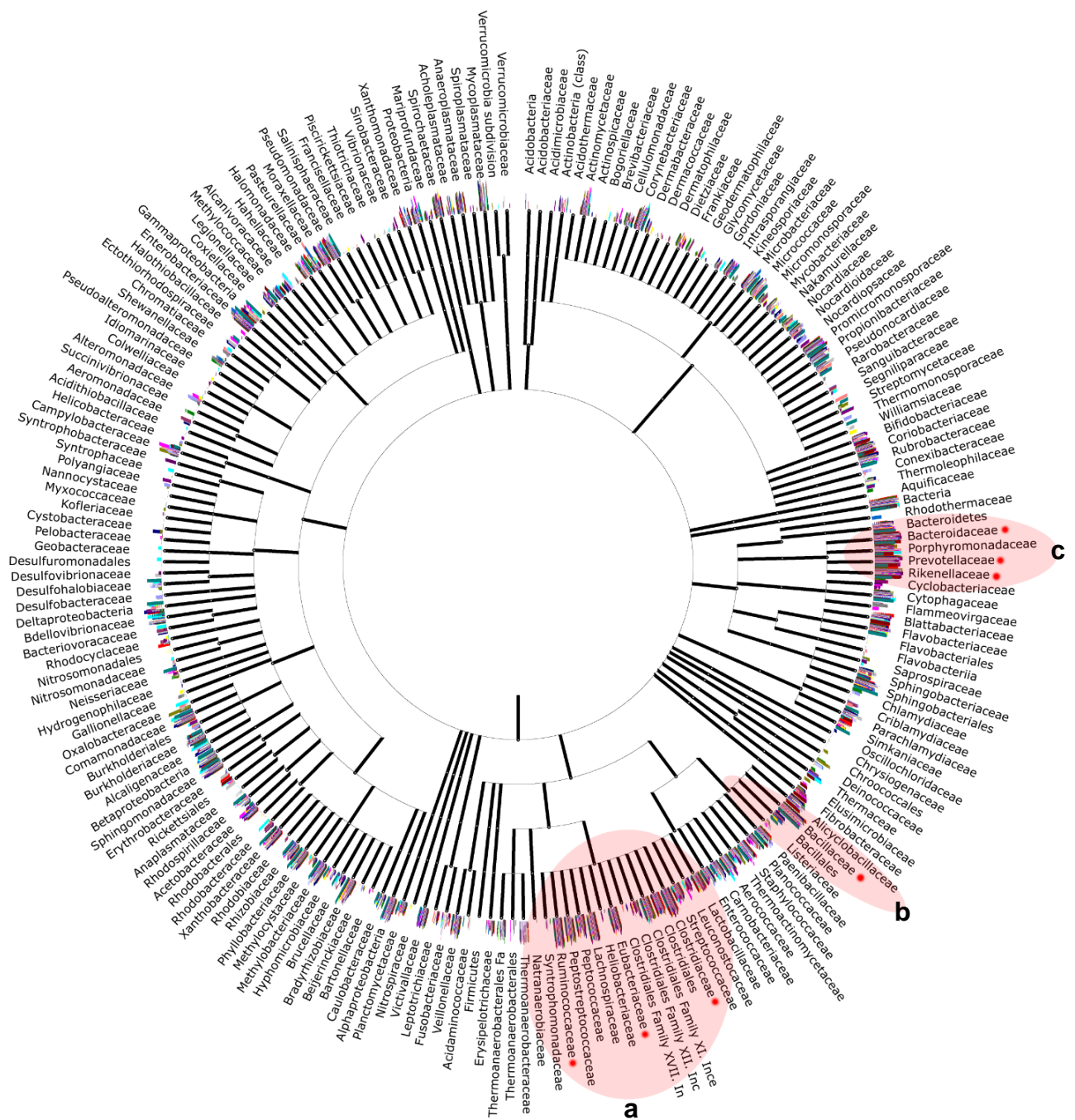


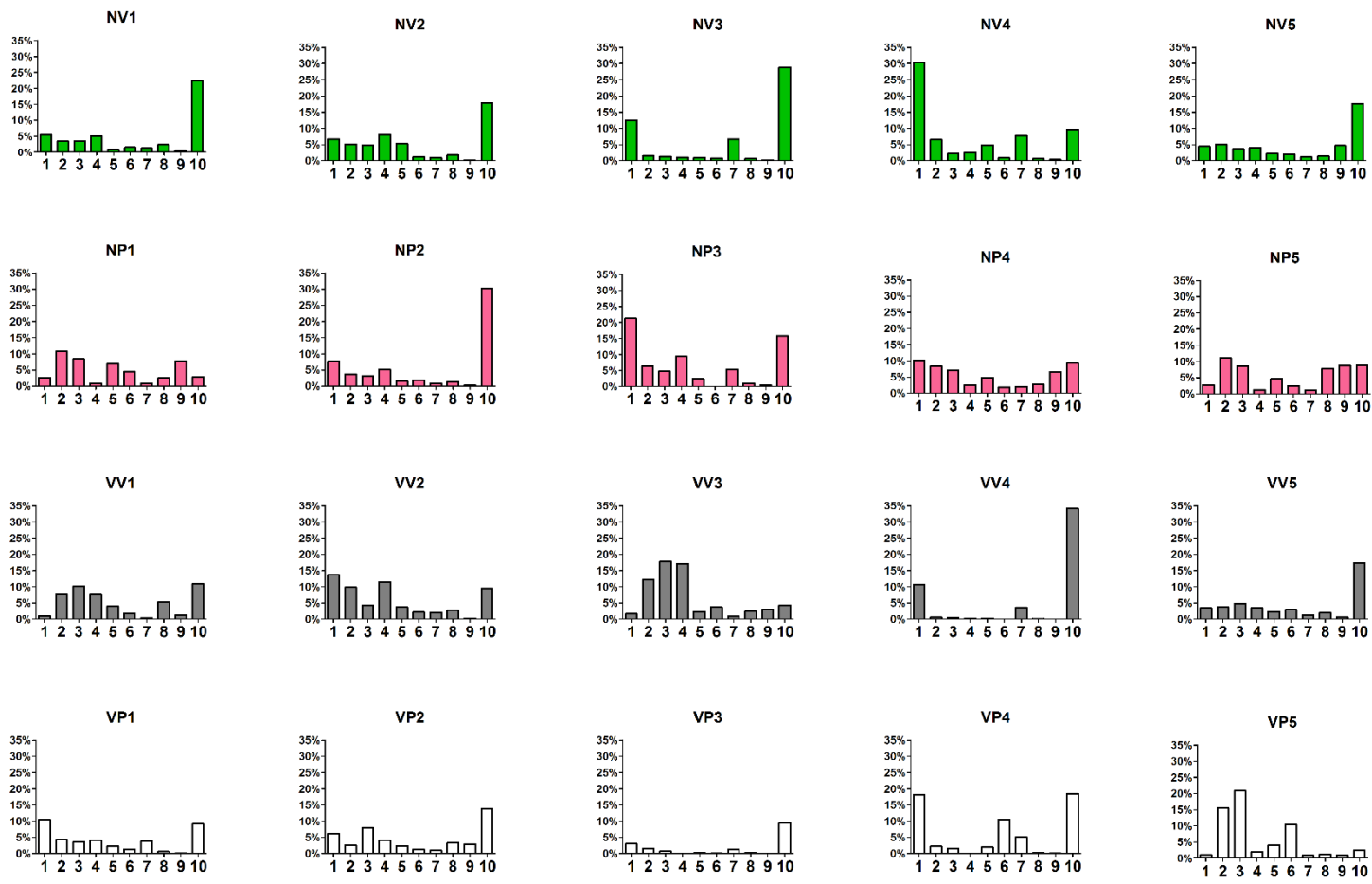
Figura 10 – Árvore filogenética destacando as famílias mais abundantes (pontos vermelhos) encontradas nas amostras. Os círculos vermelhos representam os três principais agrupamentos encontrados, contidos nas ordens *Clostridiales* (a), *Bacillales* (b) e *Bacteroidales* (c). Cada barra colorida na raiz das famílias indica a abundância normalizada daquela família numa das bibliotecas. Quanto maior a barra, mais abundante a família bacteriana em uma das bibliotecas.

Dentre as dez OTUs bacterianas mais abundantes (Figura 9), a principal é a de sequências não classificadas derivadas de *Bacteria*. Este achado não é de modo algum incomum em trabalhos de metagenômica ou de sequenciamento de organismos não cultiváveis. Vários autores já relataram a presença de grandes números de sequências não classificadas em seus trabalhos (AMANN et al., 1995; LANE et al., 1985; SINGH et al., 2008, 2009), um reflexo do vasto universo ainda inexplorado dos microrganismos. É provável que alguns microrganismos ainda desconhecidos estejam presentes nesta OTU, todavia a análise profunda de cada uma destas sequências (uma média superior a 50 mil por animal) se configuraria um trabalho à parte, que não foi possível ao longo deste trabalho. Tendo em vista a distribuição e a diversidade encontradas aqui, e o fato de que o número de *hits* encontrados dentro desta OTU em cada animal variou de 124 a 776, é mais provável que dentro deste grupo estejam várias outras OTUs de populações relativamente pequenas, seguindo o perfil encontrado nas amostras. Estas bactérias poderiam ser componentes da microbiota indígena destes animais ou mesmo organismos acidentais, questão que deverá ser resolvida em trabalhos futuros.

Nas outras nove OTUs mais abundantes, há um perfil claro de relação entre a microbiota encontrada e a microbiota do TGI bovino já conhecida. Oito delas já foram encontrados em alguma porção do TGI bovino ou nas fezes destes animais: *Bacteroides* (DOWD et al., 2008; HRISTOV et al., 2012; MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2014; ZIEMER, 2014), *Clostridium* (DOWD et al., 2008; HRISTOV et al., 2012; KIM et al., 2014; PETRI et al., 2014), *Ruminococcus* (DOWD et al., 2008; HRISTOV et al., 2012; SIJPESTEIJN, 1951), *Rikenella* (RETI et al., 2013), *Alistipes* (DOWD et al., 2008), *Bacillus* (WAGNER et al., 2011), *Eubacterium* (BRYANT, 1970; HRISTOV et al., 2012; WAGNER et al., 2011) e *Prevotella* (DOWD et al., 2008; HRISTOV et al., 2012; KIM et al., 2014; MCCANN; LOOR; WICKERSHAM, 2014). Curiosamente, o único gênero que ainda não foi relacionado ao TGI bovino, ou a qualquer TGI, é o mais abundante: *Aeribacillus* (*Firmicutes*). Este gênero foi reconhecido em 2010, diferenciado de *Geobacillus* (MIÑANA-GALBIS et al., 2010), e é conhecido por abrigar diversas bactérias termofílicas (MIÑANA-GALBIS et al., 2010; SEVIM et al., 2011). Entretanto, estudos mais recentes ligam-no também à microbiota de

alguns animais, como peixes (LARSEN et al., 2013), e mais recentemente a amostras de leite bovino (OIKONOMOU et al., 2014). Este estudo agora relata, de forma pioneira, uma grande abundância deste gênero no trato vaginal de todos os grupos analisados, ressaltando a importância desta bactéria também neste microbioma animal. O gênero *Bacillus* também já foi relatado no leite bovino, onde pode esporular e sobreviver ao processo de pasteurização, colocando em risco a produção animal e a saúde humana (MORENO SWITT et al., 2014); portanto, a presença deste gênero na microbiota vaginal deve ser observada com grande atenção. Estes dois gêneros encontrados no leite bovino são também os únicos que possuem representantes aeróbios conhecidos, dentre as dez OTUs mais abundantes no trato vaginal bovino.

Analisando os grupos não é possível definir uma microbiota dominante característica para cada um deles, nem mesmo estabelecer uma dominância clara entre os gêneros presentes no ambiente vaginal destes animais. Todavia, quando estas dez OTUs mais abundantes são analisadas em cada animal individualmente (Figura 11), pode-se perceber relações consistentes entre alguns animais, indicando a presença de diferentes grupos, ou “bacteriótipos”, dentre as microbiotas analisadas. O primeiro deles, identificado como grupo “A”, apresenta maior abundância de *Aeribacillus* e *Bacillus*, e é composto pelos animais NV3, NV4, NP3, VV4, VP1, VP3 e VP4. Estes animais provavelmente apresentam maiores concentrações de oxigênio na cavidade vaginal, o que explicaria essa maior abundância dos gêneros aeróbios *Aeribacillus* e *Bacillus*. Quando as dez OTUs bacterianas mais abundantes nestes sete animais são analisadas (Figura 12a), observa-se a presença de cinco OTUs aerotolerantes (aeróbias ou anaeróbias facultativas), quatro anaeróbias obrigatórias e o grupo das sequências não classificadas de *Bacteria*. Já o grupo “B”, formado pelos animais NV1, NV2, NV5, NP2, NP4, VV5 e VP2, provavelmente é marcado por um ambiente com concentrações de oxigênio intermediárias, exibindo apenas duas OTUs aerotolerantes (Figura 12b), sete anaeróbias obrigatórias, e o grupo das sequências não classificadas de *Bacteria*, embora *Aeribacillus* continue tendendo a ser mais abundante que os demais grupos. Por fim, o grupo “C” é caracterizado pela ausência de OTUs aerotolerantes entre as suas dez OTUs mais abundantes (Figura 12c), indicando um ambiente vaginal



Legenda:

- 1 - *Aeribacillus*
- 2 - *Bacteroides*
- 3 - *Clostridium*
- 4 - *Ruminococcus*
- 5 - *Rikenella*
- 6 - *Alistipes*
- 7 - *Bacillus*
- 8 - *Eubacterium*
- 9 - *Prevotella*
- 10 - Não Classificadas (*Bacteria*)

Figura 11 – As dez OTUs bacterianas mais abundantes em cada animal individualmente.

predominantemente anaeróbio, que limitaria ou até inibiria o crescimento de organismos aeróbios encontrados nos grupos A e B. Este derradeiro grupo é composto pelos animais NP1, NP5, VV1, VV3 e VP5.

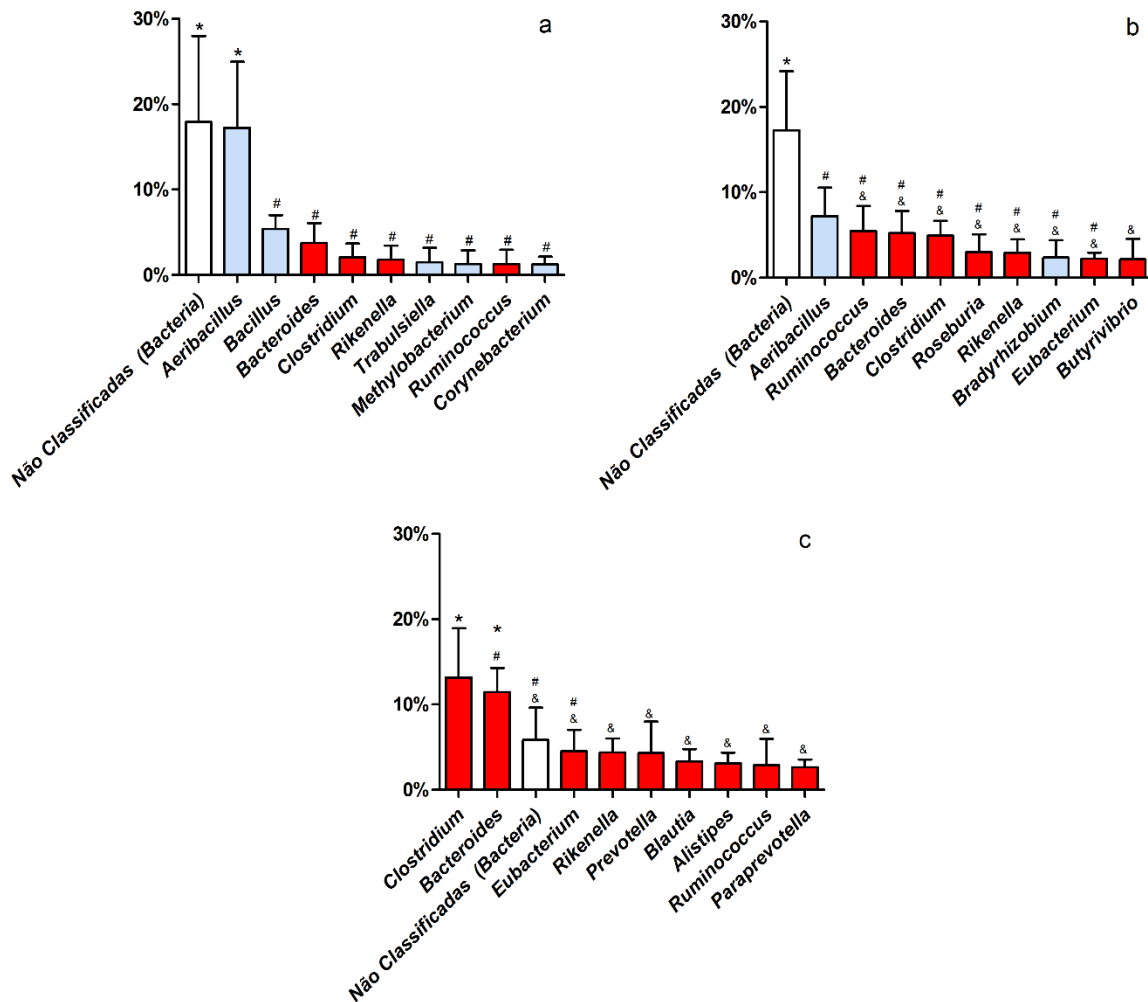


Figura 12 – Análise das OTUs bacterianas mais abundantes em cada um dos três grupos criados com base no perfil da microbiota de cada animal, apresentado na Figura 11. (a) Grupo A, composto por animais que apresentam grande abundância de gêneros bacterianos aerotolerantes. (b) Grupo B, com animais que apresentam grandes quantidades tanto de gêneros aerotolerantes quanto gêneros anaeróbios obrigatórios. (c) Grupo C, que apresenta apenas gêneros anaeróbios obrigatórios dentre os mais abundantes. As barras azuis indicam gêneros aerotolerantes, as barras vermelhas os anaeróbios obrigatórios e as barras brancas a OTU de sequências não classificadas derivadas de *Bacteria*. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Estes dados indicam que as variações individuais provavelmente são mais importantes para a formação da microbiota vaginal do que a idade e estado hormonal. Se não foi possível encontrar diferenças estatísticas entre as principais OTUs bacterianas entre os grupos NV, NP, VV e VP (Figura 9), a análise individual dos animais permitiu a identificação de três perfis distintos, que não puderam ser relacionados a nenhum parâmetro analisado neste estudo.

Isolando os fatores constantes entre os grupos (raça/genética, localização geográfica da fazenda, manejo e o estado hormonal dentro de um mesmo grupo), os fatores constantes relacionados à metodologia (data e metodologia da coleta, metodologia de tratamento do material genético, sequenciamento e análise de dados), bem como os fatores claros de diferenciação entre os grupos, que aparentemente não possuem efeito significativo na comunidade bacteriana vaginal global (estado gestacional, e a idade dos animais), permanecem apenas características individuais para explicar a variação entre os animais. É possível que pequenas diferenças anatômicas, imunológicas e fisiológicas possam ter impacto na população microbiana deste trato. Possivelmente, essas pequenas variações podem contribuir para a formação de ambientes com maiores ou menores concentrações de oxigênio, que será um fator determinante para a comunidade bacteriana deste trato.

Outro interessante fato observado é a ausência de novilhas vazias no grupo C. Este grupo é composto principalmente por anaeróbios obrigatórios, e poderia representar um estágio final de desenvolvimento da comunidade microbiana de animais com baixas concentrações de oxigênio no ambiente vaginal. Se isto for verdade, é possível que as novilhas vazias – os animais mais jovens deste estudo – apresentem uma microbiota vaginal ainda em formação. Até o presente momento, nenhum estudo demonstrou a dinâmica do desenvolvimento da microbiota do trato vaginal bovino, e estes resultados indicam que o estabelecimento de uma microbiota madura pode levar mais de dois anos.

5.2.5.3 Gêneros bacterianos de maior variação e OTUs equivalentes

De forma a tentar aumentar a abrangência das análises neste estudo, verificou-se também as dez OTUs de maior variabilidade entre os grupos, dentre as OTUs

mais abundantes que não foram analisadas na Figura 9. No gráfico da Figura 13 são apresentadas estas OTUs de maior variabilidade. É possível visualizar que em grande parte (seis de dez) as OTUs que mais variam estão presentes de forma abundante em novilhas vazias, podendo ou não estar presentes em proporção semelhante nos demais grupos. Estes dados podem ter correlação com a colonização inicial do trato, onde diversos grupos bacterianos tentarão se estabelecer, sendo o equilíbrio e a dominância entre as espécies estabelecidos ao longo do tempo. Rocha e colaboradores (ROCHA et al., 2004), estudando a microbiota vaginal cultivável de vacas Girolando no período entre o final da gestação e o puerpério, encontraram uma maior positividade no isolamento de bactérias a partir de vacas primíparas, relacionando este achado a uma maior susceptibilidade deste grupo aos microrganismos. De fato, é possível que esta maior variação observada em novilhas vazias tenha relação com os achados de Rocha e com a imaturidade da microbiota e do sistema imune destes animais. De forma semelhante ao discutido para as dez OTUs bacterianas mais abundantes, não há uma tendência lógica entre as OTUs mais variantes em relação à idade (novilhas *versus* vacas) e estado gestacional dos animais (prenhes *versus* vazias), devendo a pequena variação destes grupos ser também atribuída a outros fatores, principalmente individuais.

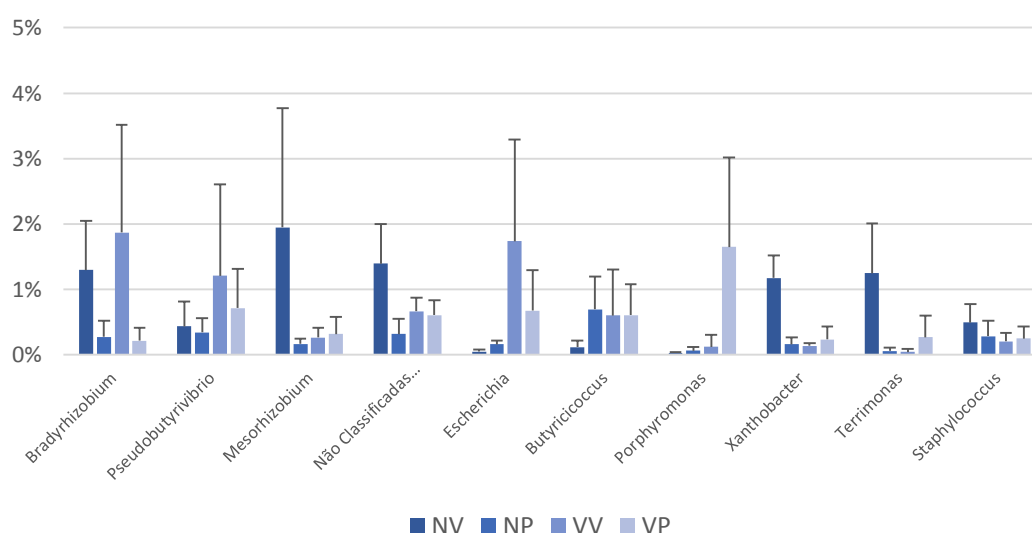


Figura 13 – As 10 OTUs mais abundantes dentre as OTUs de grande variação que não foram incluídas na Figura 9. Os dados apresentados representam as médias e o desvio padrão da abundância relativa de cada OTU em cada grupo estudado. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes.

Dentre as OTUs observados na Figura 13, há um segmento encontrado no solo – *Bradyrhizobium* (DA SILVA et al., 2014), *Mesorhizobium* (NANDASENA et al., 2014; TSURUMARU et al., 2015), *Xanthobater* (TROWER et al., 1985; VILLARREAL; TURCO; KONOPKA, 1991) e *Terrimonas* (ZHANG et al., 2011) – e outro relacionado ao TGI de animais – *Pseudobutyrvibrio* (KOPEČNÝ et al., 2003; VAN GYLSWYK; HIPPE; RAINEY, 1996; ZENED et al., 2013), *Escherichia* (SAVAGE, 1977), *Butyricoccus* (AMATO et al., 2014; EECKHAUT et al., 2008, 2013), *Porphyromonas* (GIACAMAN et al., 2008) e *Staphylococcus* (GEWOLB et al., 1999; MACFARLANE; CUMMINGS; ALLISON, 1986). As sequências não classificadas derivadas de α -Proteobacteria constituem também umas das principais OTUs variantes. No entanto, qualquer análise sobre esta OTU seria meramente especulativa, por se tratar de um grupo de bactérias bastante diverso, que engloba patógenos, como *Rickettsia* e *Brucella*, simbiontes vegetais, como *Rhizobium*, e bactérias de vida livre, como *Caulobacter*. Um destaque deve ser dado aos seguintes grupos encontrados em animais sadios: *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Porphyromonas*. Estes três gêneros são bastante conhecidos por seu potencial patogênico, inclusive no estabelecimento de quadros de vulvovaginite e infecção uterina em bovinos (ELAD et al., 2004; GANI et al., 2008). Sua presença em todos os grupos analisados indica que estes microrganismos permanecem em níveis significativos no trato vaginal destes animais ao longo da vida, mesmo em condições de saúde clínica, o que pode ajudar a explicar por que estes quadros são tão frequentes. Contudo, deve também ser lembrado que no caso de *Escherichia coli*, linhagens dessa espécie pertencem à microbiota normal de inúmeros mamíferos, incluindo o homem. Além de não apresentar patogenicidade, essas bactérias fornecem benefícios para o hospedeiro que as aloja, algumas delas sendo, inclusive, usadas como probióticos (*Escherichia coli* Nissle – Mutaflor).

De forma direta (colonização do TGI) ou indireta (ingestão), os grupos descritos na Figura 13 também podem ser relacionados ao trato gastrointestinal, assim como acontece para os descritos na Figura 9. A origem intestinal da microbiota vaginal já foi sugerida para outros animais (BADRI et al., 1977; LAGENAUR et al., 2011), e para os bovinos a colonização parece seguir o mesmo caminho, sendo a presença de diversos organismos de origem intestinal relatada por

outros autores (ROCHA et al., 2004). Entretanto, diferentemente do que acontece em outros animais, como a mulher e a macaca (RAVEL et al., 2011; SCHLIEVERT et al., 2008; WEINSTEIN, 1938), neste estudo não foi detectada a dominância numérica clara de nenhuma das OTUs sobre as demais. Também é notável que o estado gestacional não provocou alteração significativa na microbiota bacteriana no trato vaginal destes animais (Figura 6 e Figura 9). Este é um fato curioso, uma vez que a influência dos hormônios na microbiota vaginal já foi relatada em outros animais (BROTMAN et al., 2014; GAJER et al., 2012; HEINEMANN; REID, 2005; KOITER; HAZENBERG; VAN DER SCHOOT, 1977). É possível que a ausência da influência hormonal no TGU bovino permita a manutenção dos mesmos grupos dominantes quando da colonização e equilíbrio iniciais, até o fim da vida, com flutuação entre os indivíduos. Perfis semelhantes de grande diversidade de bactérias relacionadas ao TGI colonizando o TGU já foram relatados em outros animais, como búfalos (AHMED et al., 2007), cabras (GOMES, 2006), ovelhas (SILVA et al., 2011), cadelas (SANTOS, 2006) e gatas (ANDRADE, 2006), não sendo os achados deste trabalho de todo incomuns.

5.2.6 Arqueias

As arqueias apresentaram também um perfil interessante. Como foi abordado na seção 5.2.5, as populações de arqueias aumentaram significativamente ($p < 0,05$) nos animais prenhes quando comparados aos vazios de idade semelhante (novilhas *versus* vacas), embora não haja diferença estatística entre NV x VV e entre NP x VP. O resultado sugere que o estado hormonal momentâneo é mais relevante para os níveis populacionais das arqueias no trato geniturinário do que a idade e maturidade hormonal. Desta forma, é possível que estes organismos não se estabeleçam neste ambiente, mas sim sejam mantidos por estados ecológico e imunológico distintos, influenciados pelos hormônios (BEAGLEY; GOCKEL, 2003; OLIVEIRA et al., 2012; SHELDON et al., 2009), e apenas durante ele, uma vez que vacas vazias não apresentam grandes quantidades de arqueias na cavidade vaginal. Ruan e colaboradores (RUAN et al., 2013) demonstraram uma correlação positiva entre a atividade de arqueias e a presença de 17β -Estradiol, mas a relação entre arqueias e progesterona – o hormônio que predomina durante a maior parte da prenhez - ainda não foi

estabelecida. Possivelmente não apenas a atividade hormonal, mas principalmente a variação ecológica observada nas populações de bactérias possui um efeito positivo na população de arqueias – conforme discutido anteriormente, na seção 5.2.5.

5.2.6.1 Filos e gêneros de arqueias e OTUs equivalentes

Apenas um filo de arqueias foi observado em todos os quatro grupos estudados, *Euryarchaeota*. Dentre os gêneros encontrados, há um forte predomínio de *Methanobrevibacter* ($p < 0,05$; Figura 14), representando quase 60% das arqueias em cada grupo, o que corrobora os dados encontrados na Figura 5. Este gênero é um dos organismos mais importantes no rúmen bovino - possuindo um papel central no metabolismo de compostos de origem vegetal (CARBERRY et al., 2014; HRISTOV et al., 2012; LEE et al., 2013) - e também está presente no TGI de outros animais, incluindo o homem (GACI et al., 2014; KHELALFIA et al., 2014; SNELLING et al., 2014). Estes dados mais uma vez apontam para uma relação íntima entre as microbiotas do TGI e do trato vaginal em bovinos; como o lúmen vaginal é exposto a grandes quantidades de *Methanobrevibacter* provenientes do TGI, o mais provável é que esta seja a origem destes organismos encontrados no trato vaginal. A variação deste gênero também apresenta um perfil claramente observável entre os grupos estudados. Animais prenhes tendem a apresentar uma proporção maior de *Methanobrevibacter*, em detrimento de sequências não classificadas de *Euryarchaeota* (Figura 14). Observações semelhantes podem ser feitas analisando as arqueias do trato vaginal bovino como um todo. A Figura 6 mostra uma grande diferença entre as populações de arqueias nos animais prenhes e vazios, tanto em números absolutos quanto em números relativos, sendo estes microrganismos muito mais abundantes nos prenhes. É possível que eles não tenham um papel demarcado e preponderante na microbiota normal, surgindo apenas num contexto específico (prenhez). De forma semelhante ao observado em bactérias, futuros trabalhos deverão estabelecer a relação entre microbiota arqueal e estado hormonal, imunológico e ecológico no trato vaginal destes animais.

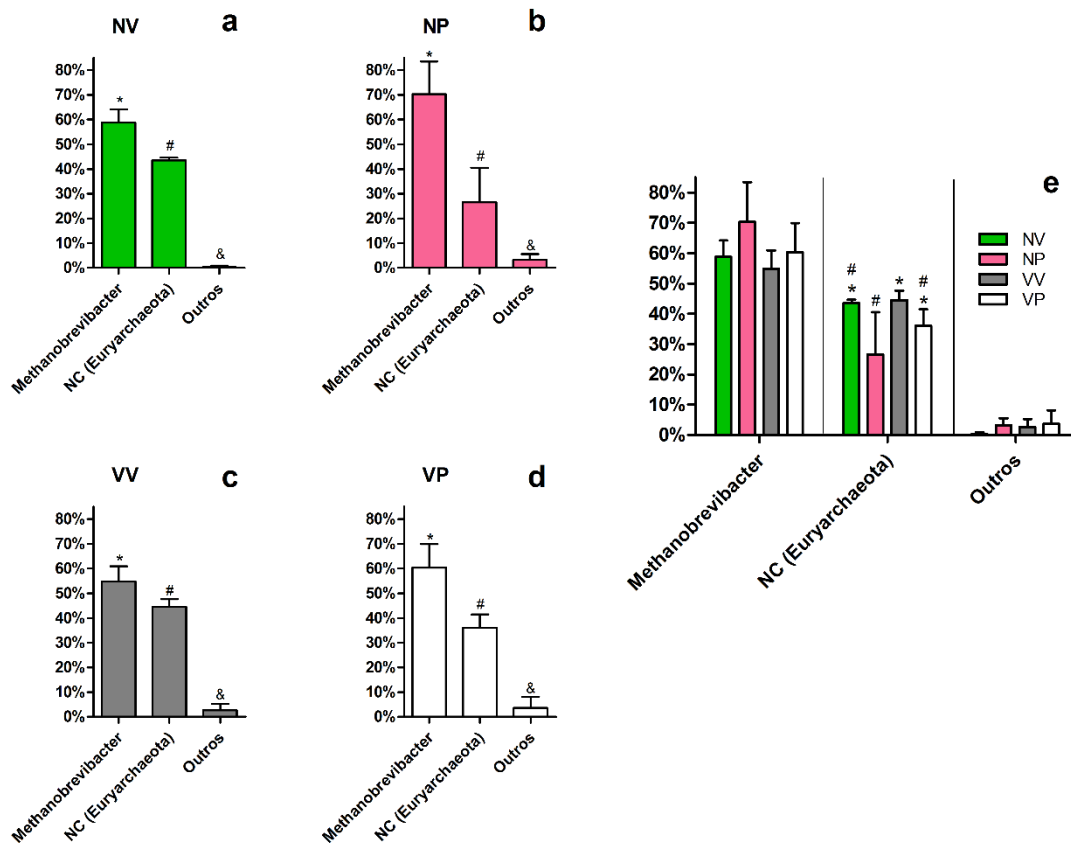


Figura 14 - OTUs mais abundantes de Arqueias, em nível de gênero. (a-d) Abundância relativa das OTUs em cada grupo. (e) Comparação entre a abundância de cada OTU entre os grupos. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes, NC – Não Classificadas. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2.7 Eucariotos

Os dados apresentados na Figura 6 sugerem uma tendência a um aumento dos números de eucariotos em vacas adultas. Estes resultados podem estar relacionados às mudanças morfológicas trazidas pela maturidade hormonal e física destes animais, ou a uma possível colonização deste trato por organismos eucariotos ao longo da vida, não sendo estes organismos afetados, ao menos quanto a seus números populacionais, por níveis e classes de hormônios bovinos.

5.2.7.1 Filos fúngicos e OTUs equivalentes

As análises de eucariotos enfocaram a presença de fungos no trato vaginal das vacas, sendo que apenas dois filos (*Ascomycota* e *Basidiomycota*) correspondem a quase 90% dos eucariotos presentes em todos os grupos (Figura 15). *Ascomycota* predomina em todos os grupos estudados ($p < 0,05$), mostrando uma tendência à redução em situações de prenhez (Figura 15).

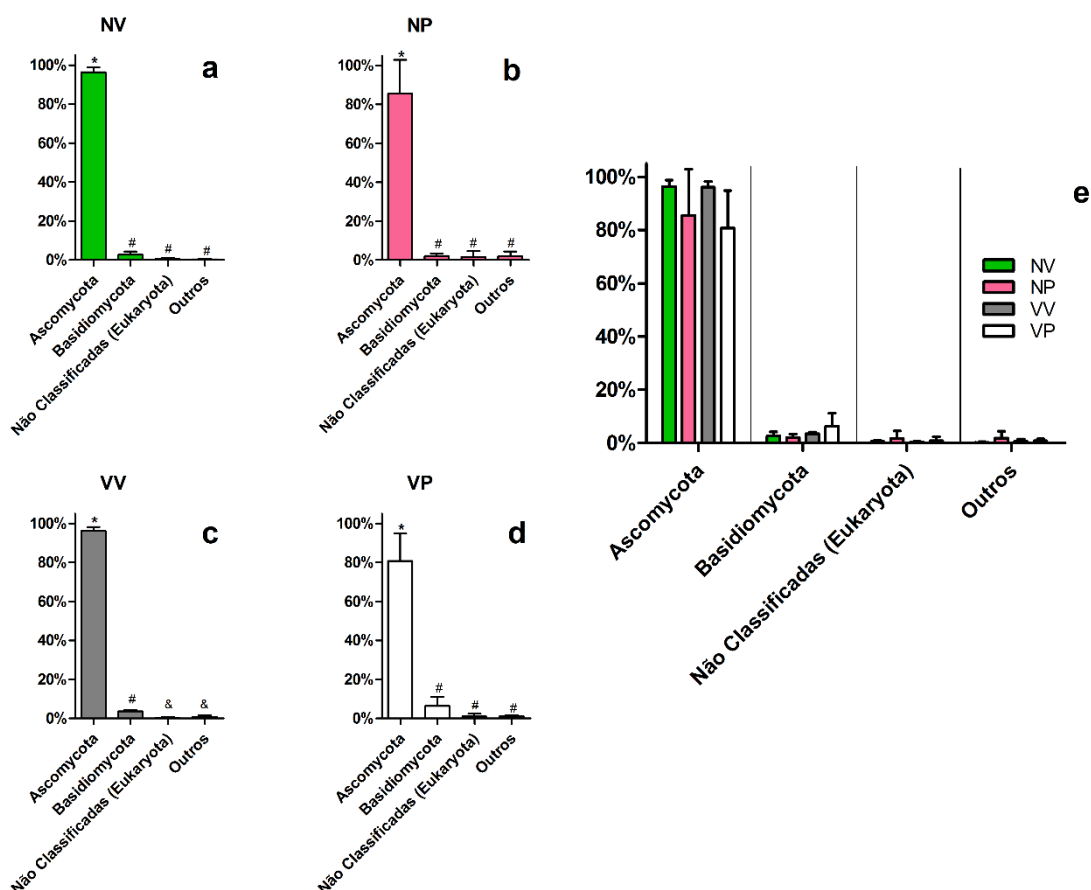


Figura 15 – OTUs mais abundantes de Fungos, em nível de filo. (a-d) Abundância relativa das OTUs em cada grupo. (e) Comparação entre a abundância de cada OTU entre os grupos. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2.7.2 Gêneros fúngicos e OTUs equivalentes

Dentre as OTUs mais abundantes de fungos, o gênero *Mycosphaerella* apresenta abundância relativa entre 70 e 85% nos grupos estudados (Figura 16)

e predomina sobre todos os demais ($p < 0,05$), também corroborando o achado apresentado na Figura 5. Este é um gênero de fungos endofíticos comumente encontrados no solo (EL-SAID; SALEEM, 2008), que abriga algumas espécies de patógenos de gramíneas e outras plantas (DHILLON et al., 2014; MCDONALD; MCDONALD; SOLOMON, 2015). Alguns autores já relataram a eficiência destes fungos em produzir compostos com atividade antagonista contra protozoários (MORENO et al., 2011) e até mesmo contra outros fungos patogênicos (PEREIRA et al., 2015). Todavia, até esta data, nenhum estudo havia descrito o isolamento ou mesmo a identificação deste organismo em microbiotas animais, sendo este trabalho pioneiro neste sentido. A atividade antagonista poderia explicar a preponderância desta OTU em detrimento de outros gêneros fúngicos, permitindo que este microrganismo prospere no ambiente do trato vaginal das vacas, ao mesmo tempo em que confere proteção contra agentes patogênicos a estes animais. Caso a colonização do trato vaginal bovino realmente se dê por influência do TGI, é provável que a presença de *Mycosphaerella* na vagina das vacas esteja relacionada à ingestão destes fungos. Portanto, a presença ou não desta mesma OTU em outros animais dependeria significativamente do manejo e do ambiente onde estejam situados. É possível detectar, também na Figura 16, uma tendência à diminuição da proporção de *Mycosphaerella* em animais prenhes, e um aumento de outras OTUs pouco representadas. Entretanto, da mesma forma que acontece com os eucariotos de uma forma geral (Figura 6), o número absoluto desta OTU não apresenta uma diferença significativa entre animais prenhes e vazios. Portanto, essa variação, se real, seria explicada pelo aumento da diversidade e dos números de outras OTUs, não pela redução dos números de *Mycosphaerella*. Este comportamento, permitindo a proliferação de diversas OTUs pouco representadas, se encaixa com o esperado em contextos de imunossupressão, como é o caso de animais prenhes (BEAGLEY; GOCKEL, 2003; OLIVEIRA et al., 2012).

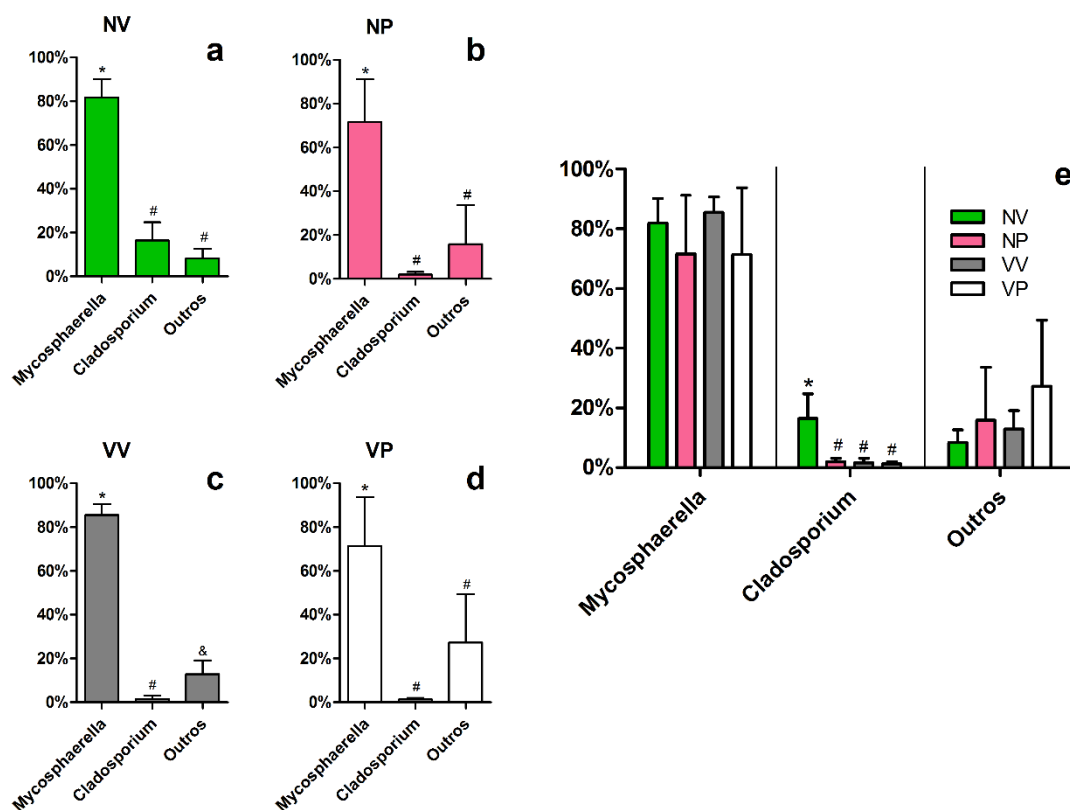


Figura 16 - OTUs mais abundantes de Fungos, em nível de gênero. (a-d) Abundância relativa das OTUs em cada grupo. (e) Comparação entre a abundância de cada OTU entre os grupos. NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias, VP – Vacas Prenhes. Os diferentes símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.3 A relação TGI x trato vaginal em vacas

Todos os achados neste trabalho sugerem uma forte relação entre a colonização do trato reprodutivo e o trato digestivo das vacas. A proximidade anatômica entre estes tratos poderia explicar essa influência na colonização. Em vacas, a vulva é localizada imediatamente abaixo do ânus e frequentemente é encontrada coberta por fezes (Figura 17 e Figura 18). A ampla abertura da vulva poderia permitir a colonização por microrganismos provenientes do trato digestivo ainda em estágios iniciais da vida. De fato, muitas doenças do trato reprodutivo são causadas por microrganismos encontrados nas fezes destes animais (DOHMEN et al., 1995; LEBLANC; OSAWA; DUBUC, 2011; WILLIAMS et al., 2005), e sua presença na microbiota vaginal poderia explicar porque a ocorrência de endometrite pós-parto é tão comum, ocorrendo em quase 90% das vacas

(OTERO et al., 2000). A relação entre as fezes e o trato genital é tão forte que vacas com Vulva Horizontal (que formam ângulo $> 45^\circ$ com o plano vertical) podem apresentar fezes dentro da cavidade vaginal (GAUTAM; NAKAO, 2009). A urovagina, uma condição clínica onde a urina é acumulada na porção cranial da vagina, muitas vezes produzindo uma solução de continuidade ao longo do órgão, já foi relacionada positivamente com uma maior probabilidade de endometrite (GAUTAM; NAKAO, 2009). Vacas com variações anatômicas podem apresentar Urovagina permanente, mas muitas vacas saudáveis a apresentam como condição transiente imediatamente após o parto, ou durante o estro (ST JEAN et al., 1988). Este fato pode ter um impacto significativo na colonização vaginal das vacas adultas, e mesmo das novilhas, uma vez que o estro pode acontecer antes mesmo que o animal alcance a puberdade (NELSEN et al., 1985).

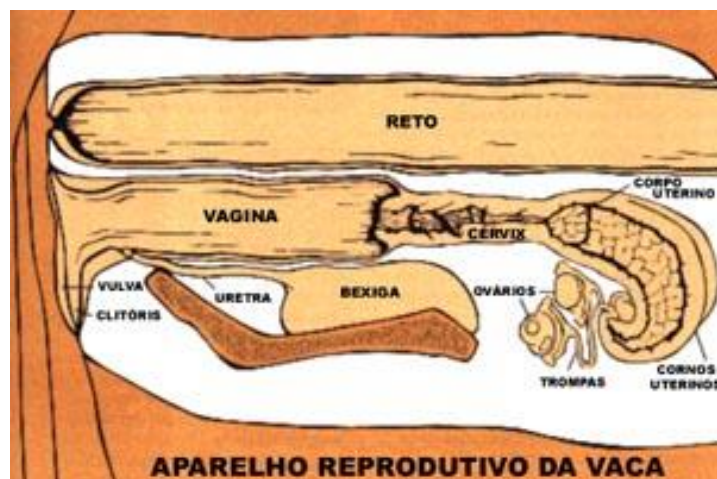


Figura 17 – Representação esquemática do aparelho reprodutivo de uma vaca, indicando a posição da vagina e do reto. Extraída de www.inseminaçãoartificial.com.br.

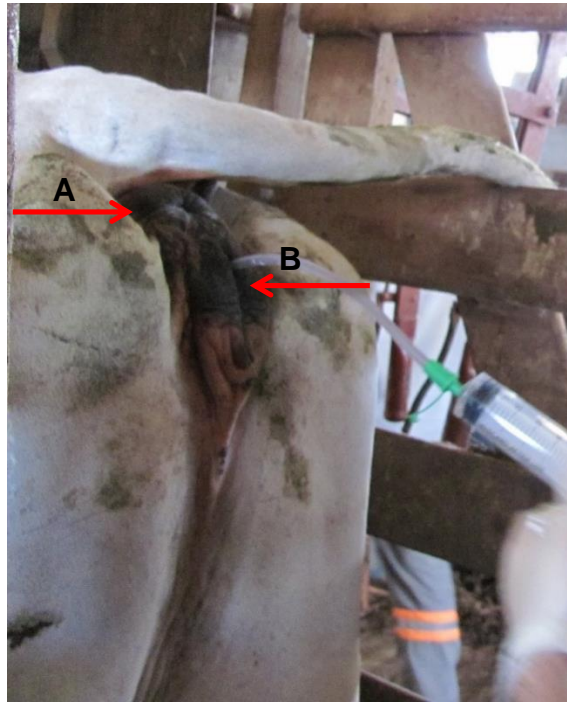


Figura 18 – Região posterior do animal no momento da coleta. Setas indicam a posição do ânus (A) e da vulva (B). Marcas de fezes podem ser observadas por toda a região.

5.4 A formação e a manutenção da microbiota vaginal em bovinos

Considerando todos os dados aqui apresentados, bem como os fatores que circundam os tratos vaginal e digestivo destes animais, a hipótese da origem intestinal da microbiota do trato vaginal parece ser a mais plausível. Desde novilhas, os animais aqui estudados apresentam uma forte tendência neste sentido. Bactérias, arqueias e fungos do TGI, colonizadores ou ingeridos e acidentalmente presentes, estabelecer-se-iam no trato vaginal, eventualmente formando a microbiota aqui revelada, composta por uma grande diversidade de organismos relacionados, direta ou indiretamente, ao TGI, dominada por *Mycosphaerella*, *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus* – além de vários outros microrganismos de abundância significativa, porém menor – tendo *Methanobrevibacter* como arqueia dominante em períodos de prenhez. Este trabalho também contraria a hipótese de alguns autores, como Amin e colaboradores (AMIN; ZARIA; MALGWI, 1996), de que a maturidade hormonal teria efeito significativo na formação da microbiota do trato vaginal. Tal efeito não foi observado e nem pode ser inferido pelos dados apresentados. Todavia, a

cópula poderia ter ainda algum efeito neste trato; como a comunidade microbiana do TGU de machos não foi alvo deste trabalho e as fêmeas investigadas eram alvo de inseminação, e não monta, este evento poderia influenciar a microbiota em formação, e deveria ser um alvo para investigações posteriores. Os resultados apontam para uma grande importância da variabilidade individual na formação e manutenção da microbiota, sendo possível que variações anatômicas possibilitem ambientes vaginais com níveis de oxigenação diferentes entre os animais, influenciando a microbiota residente

Pela primeira vez a composição da microbiota do trato geniturinário de fêmeas bovinas foi extensivamente estudada, usando métodos independentes de cultivo, por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração. A novidade dos dados aqui apresentados pode ser pontuada em muitos aspectos além da própria caracterização da microbiota, como a presença de *Aeribacillus* em um trato geniturinário animal, e a presença de *Mycosphaerella* em um trato animal. É evidente que um estudo marcado pelo ineditismo dificilmente esgotaria as perguntas, tendo como objetivo secundário levantar tais perguntas, traçar bases e definir caminhos para outros estudos. No entanto, um panorama bastante sólido pode ser desenhado com base nos achados aqui apresentados. Futuros trabalhos deverão ampliar os horizontes deste campo, com outras raças e condições de manejo, imunidade e hormônios, de forma a confirmar os achados deste estudo, ou estabelecer um novo paradigma.

5.5 Análises dos microrganismos cultiváveis isolados

5.5.1 Análise e quantificação das colônias isoladas

Após o cultivo das amostras de lavado, foi feita uma análise e quantificação das colônias obtidas tanto em anaerobiose, quanto em aerobiose, e em todos os meios de cultura utilizados. Não houve crescimento no meio de cultura MRS em aerobiose. Os demais resultados são apresentados na Tabela 6. É notável o padrão seguido pelas amostras: Os animais prenhes apresentaram uma taxa de isolamento superior aos não prenhes, em número de amostras com crescimento e/ou log deste crescimento. A mesma relação é observada quando os grupos são comparados por idades. O grupo das vacas apresenta mais animais com

crescimento e/ou uma maior contagem de colônias, quando comparado ao grupo das novilhas em situação semelhante (vazia *versus* vazia, prenhe *versus* prenhe).

Aerobiose				
Grupo	Ágar Sangue		Ágar Mac Conkey	
	Amostras com crescimento	Log (Média) do Crescimento	Amostras com crescimento	Log (Média) do Crescimento
NV	20%	3,114	0%	0,000
NP	80%	4,155	20%	4,484
VV	60%	3,462	20%	3,908
VP	100%	4,627	20%	*
Anaerobiose				
Grupo	Ágar Sangue		Ágar MRS	
	Amostras com crescimento	Log (Média) do Crescimento	Amostras com crescimento	Log (Média) do Crescimento
NV	40%	3,505	0%	0,000
NP	80%	4,305	20%	2,301
VV	60%	3,978	20%	2,602
VP	100%	4,752	20%	2,903

Tabela 6 – Quantificação do isolamento das amostras de lavado. * - Quantidade de colônias incontável. Grupos: NV – Novilhas Vazias, NP – Novilhas Prenhes, VV – Vacas Vazias e VP – Vacas Prenhes. Crescimento: 0% = 0 de 5 animais, 20% = 1 de 5 animais, 40% = 2 de 5 animais, 60% = 3 de 5 animais, 80% = 4 de 5 animais e 100% 5 de 5 animais.

O total de isolados obtidos nesse trabalho é baixo, se comparado a outras espécies de animais (HERTHELIUS et al., 1989; REID et al., 1985), girando entre log 2 e 4 por ml do lavado. A quantidade de isolados em MRS também é baixa, o que indica que a quantidade de lactobacilos presentes e isoláveis nestas condições é bem inferior ao encontrado em mulheres, por exemplo, em acordo com o que já foi descrito por Otero e colaboradores (OTERO et al., 1999) e com os achados da metagenômica. Ao contrário do observado nas análises moleculares anteriores, a metodologia baseada no cultivo mostrou uma influência inversa do estado hormonal na quantidade de microrganismos isolados, com um aumento nos animais prenhes. Já no caso da idade, houve

concordância entre os métodos independentes e dependentes de cultivo com os animais mais velhos, já havendo passado pela puberdade e por pelo menos uma gestação, apresentando sempre uma colonização maior que os mais jovens, pré-púberes. Outros autores já descreveram a estreita relação entre o estado hormonal e a colonização bacteriana para microrganismos cultiváveis (GARCÍA-GÓMEZ; GONZÁLEZ-PEDRAJO; CAMACHO-ARROYO, 2013; JENTSCH; MÄRZ; KRÜGER, 2013; OTERO et al., 1999; PELZER et al., 2012), e aqui o mesmo foi observado. É intrigante a diferença neste ponto entre os trabalhos independentes e os dependentes de cultivo. As principais diferenças entre estas técnicas são a abrangência e a profundidade da análise, sendo a primeira mais abrangente e de maior cobertura, e a segunda limitada a microrganismos e meios de cultivo específicos. Desta forma, uma possível explicação para essa diferença é a própria microbiota indígena deste trato. As bactérias geralmente isoladas e descritas para este ambiente não são as apontadas como mais abundantes na análise metagenômica descrita na primeira parte deste trabalho. Talvez por isso, outros autores já tenham relatado este ambiente como pobre em número de espécies (OTERO et al., 1999), o que pode não corresponder à realidade. Tendo em vista os achados aqui descritos, novos trabalhos de isolamento podem ser realizados, visando os microrganismos mais abundantes (se possível), de forma a obter um panorama da abundância real da microbiota deste trato. É provável que o estado hormonal tenha um efeito, mesmo que pequeno, em alguns microrganismos de crescimento rápido e baixos requerimentos nutricionais, marcando assim este fenômeno nos microrganismos isolados. Todavia, de um modo geral, este não é o observável nas análises metagenômicas e, à luz destas novas informações, mais investigações devem ser realizadas de modo a compreender melhor esta discrepância.

Interessantemente, os resultados obtidos nos isolamentos utilizando Ágar Sangue em condições anaeróbias e aeróbias foram similares, o que sugere que sejam os mesmos isolados anaeróbios facultativos que podem crescer nas duas atmosferas.

5.5.2 Análise morfo-tintorial dos isolados

Foram isolados 69 clones crescidos em anaerobiose e 65 crescidos em aerobiose. Embora dentre os isolados tenham sido observados mais de 15 morfotipos de colônias diferentes (Figura 19), a coloração de Gram mostrou que a maioria era bastonetes Gram negativos, como mostrado na Figura 20.

5.5.3 Sequenciamento tradicional das bactérias isoladas

Inicialmente, foi testada a hipótese de que a maioria dos isolados em anaerobiose eram os mesmos obtidos em aerobiose (anaeróbios facultativos). As bactérias anaeróbias em questão foram, então, cultivadas em caldo BHI em condições de aerobiose, por 24 horas, a 37°C. Como resultado, todas apresentaram crescimento, confirmando então a hipótese anterior. Foi decidido trabalhar apenas com os isolados em anaerobiose.

O DNA de todas as 69 bactérias analisadas a partir de então neste trabalho foi extraído, e em seguida, cada bactéria teve uma região 16S de seu rRNA amplificado e sequenciado. Como resultado, aproximadamente 87% dos isolados (60 de 69) pertencem ao gênero *Escherichia*, sendo os demais 9 isolados pertencentes aos gêneros *Cellulosimicrobium* (4), *Streptococcus* (4) e *Aerococcus* (1). Este resultado, embora muito diferente do que ocorre para outros mamíferos, encontra similares na literatura. Otero e colaboradores (OTERO et al., 1999) afirmaram que a microbiota vaginal em bovinos seria composta por *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e enterobactérias, embora eles tenham isolado uma maioria de enterococos, o que não foi observado neste estudo. Mesmo não tendo nenhum representante entre as dez OTUs bacterianas mais abundantes, a família *Enterobacteriaceae* possui muitos representantes nas sequências encontradas na análise metagenômica realizada neste trabalho (Figura 21). A abundância relativa desta família, aliada à facilidade de cultivo, especialmente do gênero *Escherichia*, pode explicar a predominância destes organismos entre os cultiváveis.

A ausência de microrganismos anaeróbios obrigatórios é notada, e pode ser justificada por uma limitação técnica no isolamento, já que optou-se pela

utilização de apenas solução salina na realização do lavado, e não meios adequados ao isolamento e transporte de anaeróbios, por receio que pudesse ocorrer qualquer efeito negativo na purificação e sequenciamento das amostras causado pela presença de componentes não inertes.

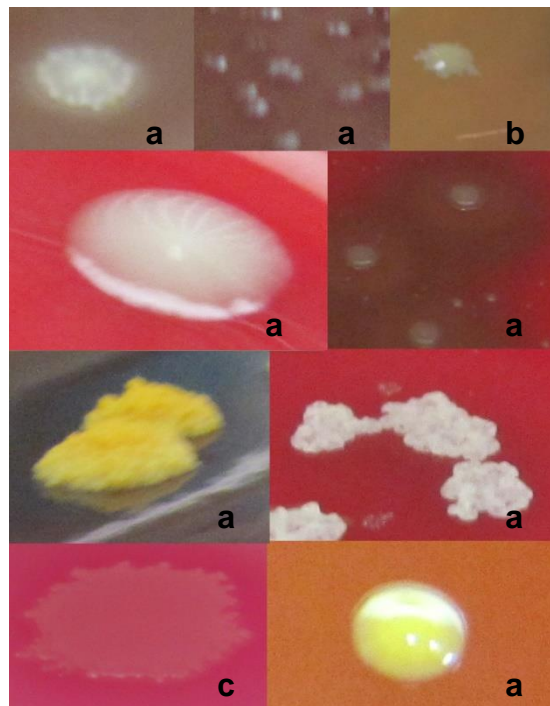


Figura 19 – Imagem representativa dos morfotipos isolados dos lavados. Podem ser observadas colônias de diferentes pigmentações, convexas e planas, regulares e irregulares, cremosas, rugosas, hemolíticas e não hemolíticas. Bactérias isoladas em Ágar Sangue (a), Ágar MRS (b) ou Ágar MacConkey (c).

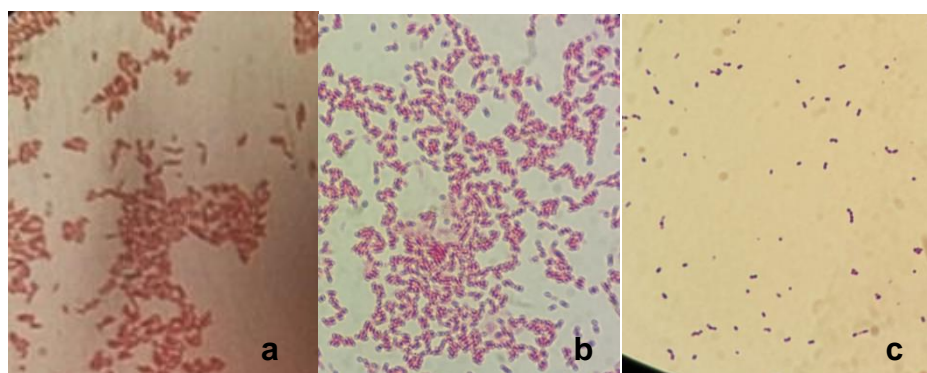


Figura 20 – Imagem representativa da análise morfo-tintorial dos isolados. A maior parte apresentou morfotipo semelhante a bastonetes Gram negativos (a e b), todavia outros morfotipos também foram identificados, como cocos Gram positivos (c).

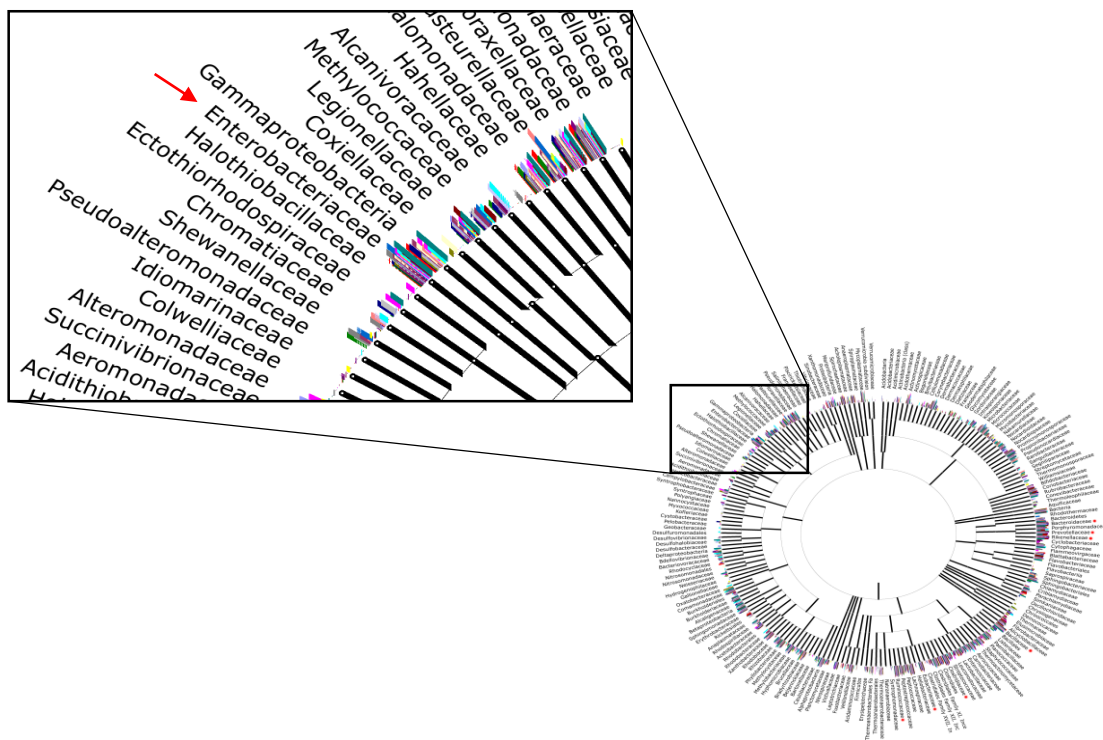


Figura 21 – Árvore filogenética das OTUs encontradas dentro as famílias bacterianas presentes nas amostras analisadas por técnicas independentes de cultivo. A seta vermelha indica a família *Enterobacteriaceae*, que abrange o gênero *Escherichia*. As barras coloridas presentes na base do nome das famílias indicam a abundância de uma referida OTU em cada biblioteca sequenciada.

5.5.4 Ensaios de antagonismo

As 69 amostras foram então distribuídas em placas contendo ágar BHI, para os ensaios de antagonismo, tendo cinco bactérias como reveladores: *Staphylococcus chromogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. e dois *Streptococcus* sp., identificados como 1 e 2, todos previamente isolados de casos clínicos. A Figura 22 é uma imagem representativa dos ensaios efetuados. Nenhuma das colônias isoladas foi capaz de produzir antagonismo contra os reveladores testados. Interessantemente, quando foi realizado o mesmo ensaio, porém exclusivamente com as bactérias isoladas em Ágar MRS (um total de 11), e utilizando o mesmo meio para a revelação do antagonismo, alguns halos de inibição foram obtidos como observado numa fotografia representativa da Figura 23. A Tabela 7 resume os resultados e mostra que houve tanto fenômenos de iso-antagonismo (*E. coli* contra *E. coli*, por exemplo) como de hetero-antagonismo (*E. coli* contra *Streptococcus*). Das onze bactérias testadas, todas

apresentaram antagonismo contra pelo menos uma das reveladoras patogênicas. Os melhores resultados (antagonismo contra todas as reveladoras) foram obtidos com alguns dos isolados de *Escherichia* (12, 21, 25), de *Streptococcus* (27) e de *Aerococcus* (41g).

Das onze bactérias testadas, cinco apresentaram antagonismo contra todos os reveladores testados. Numa observação geral, das em 55 interações observadas, houve inibição em 44 delas (Tabela 7). Este resultado demonstra o potencial probiótico das amostras isoladas, nas condições adequadas.



Figura 22 – Antagonismo negativo usando *Staphylococcus chromogenes* como bactéria reveladora em meio BHI. Representativo do resultado para todas as bactérias e todos os reveladores testados.



Figura 23 – Antagonismo positivo entre duas das bactérias testadas crescidas em ágar MRS e o revelador *Staphylococcus chromogenes*.

Isolado		Bactéria Reveladora				
Código	Gênero	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> sp. 1	<i>Streptococcus</i> sp. 2	<i>S. chromogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
8	<i>Escherichia</i>	-	+	+	+	+
12	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+
19	<i>Streptococcus</i>	+	+	+	-	+
21	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+
25	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+
27	<i>Streptococcus</i>	+	+	+	+	+
30	<i>Escherichia</i>	+	+	-	+	-
31	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	-
41p	<i>Cellulosimicrobium</i>	+	+	+	-	-
41g	<i>Aerococcus</i>	+	+	+	+	+
45	<i>Streptococcus</i>	-	-	+	-	-

Tabela 7 – Resultado do ensaio de antagonismo usando bactérias isoladas em MRS e os reveladores indicados. + e - indicam presença e ausência de halo de inibição, respectivamente.

5.5.5 Produção de peróxido de hidrogênio

As onze bactérias candidatas a probiótico foram testadas quanto a sua capacidade de produzir peróxido de hidrogênio. O resultado pode ser visualizado na Figura 24. Sete isolados foram considerados positivos: 12, 19, 27, 30, 41p, 41g e 45.

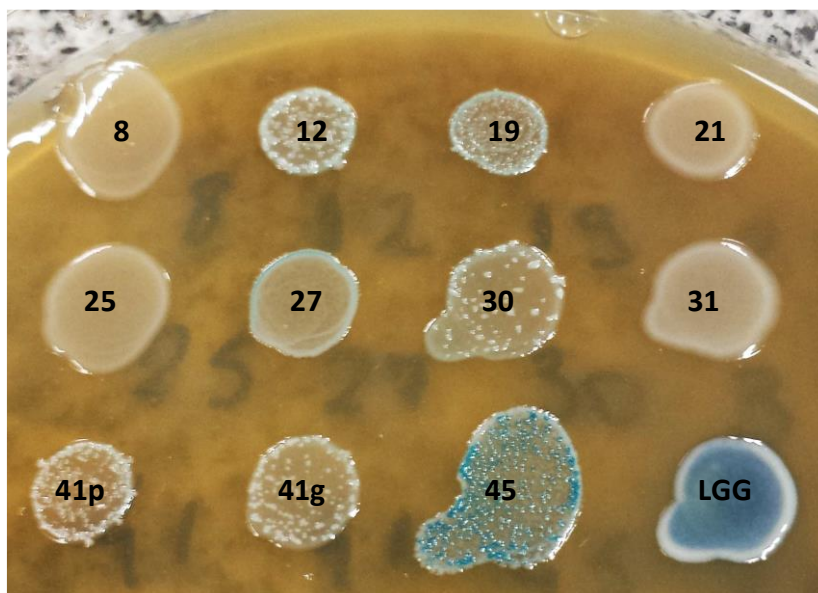


Figura 24 – Produção de peróxido de hidrogênio pelos candidatos a probiótico. Os isolados podem ser identificados por seu número de identificação (8, 12, 19, 21, 25, 27, 30, 31, 41p, 41g e 45). LGG – *Lactobacillus rhamnosus* (Controle positivo).

5.5.6 Teste de hidrofobicidade

Sendo a hidrofobicidade uma característica também desejável para um probiótico (capacidade de adesão ao epitélio e de imunomodulação), os candidatos isolados neste trabalho também foram submetidos a este teste. Como resultado, todos os isolados apresentaram um nível médio de hidrofobicidade, variando de 40 a 55%.

5.5.7 Teste de co-agregação

Por fim, foram realizados ensaios de co-agregação a patógenos, sendo a habilidade dos isolados em agregar-se a microrganismos patogênicos classificada por um escore de 0 a 4, indicando o nível de agregação observado

ao microscópio (Figura 25). Os resultados estão resumidos na Tabela 8. Como a observação deste efeito depende da coloração de Gram, não foi possível realizar ensaios de co-agregação envolvendo duas bactérias de mesma morfologia (Bacilo Gram negativo x Bacilo Gram negativo, etc.), pois seria impossível distinguir entre elas e, por conseguinte, diferenciar uma agregação inter-específica de uma intra-específica. As diferentes bactérias isoladas apresentaram níveis de co-agregação muito distintos, variando de 0 (nenhuma co-agregação) a 4 (nível máximo de co-agregação) dependendo do isolado e do revelador observados.

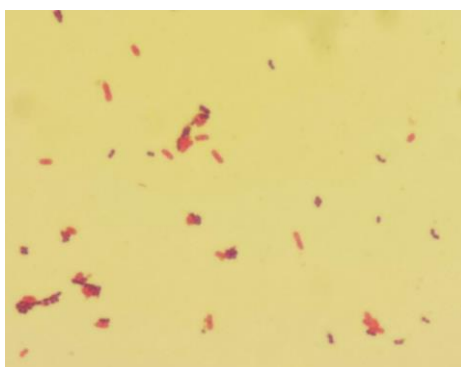


Figura 25 – Coloração de Gram de um teste de co-agregação realizado entre um coco Gram positivo e um bacilo Gram negativo.

Isolado		Patógeno				
Identificação	Gênero	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> sp. 1	<i>Streptococcus</i> sp. 2	<i>S. chromogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
8	<i>Escherichia</i>	-	2	3	1	1
12	<i>Escherichia</i>	-	1	3	4	1
19	<i>Streptococcus</i>	4	-	-	-	-
21	<i>Escherichia</i>	-	1	2	1	1
25	<i>Escherichia</i>	-	0	4	1	2
27	<i>Streptococcus</i>	3	-	-	-	-
30	<i>Escherichia</i>	-	2	2	3	2
31	<i>Escherichia</i>	-	2	1	3	3
41p	<i>Cellulosimicrobium</i>	1	3	-	3	2
41g	<i>Aerococcus</i>	4	-	-	-	-
45	<i>Streptococcus</i>	3	-	-	-	-

Tabela 8 – Resumo do teste de co-agregação. Os resultados são apresentados num escore de 0 a 4, indicando o nível de co-agregação observado.

5.5.8 Escore padronizado dos candidatos a probiótico

De modo a procurar entender melhor o potencial probiótico de cada um dos isolados, e eliminar o máximo de subjetividade possível das avaliações, foi estabelecido um escore padronizado para os isolados, levando em conta os resultados do antagonismo, produção de peróxido de hidrogênio e da co-agregação. Os resultados do perfil de hidrofobicidade não foram levados em consideração pois se apresentaram iguais para todos os isolados e, portanto, não influenciariam na escolha do probiótico.

Brevemente, os resultados qualitativos e quantitativos de todos os três testes foram transformados em apenas um número, e construídos de forma a dar importância semelhante ao antagonismo e à co-agregação (40% do escore total para cada), considerados os testes mais importantes na escolha de um probiótico para nosso grupo, e um peso menor para a produção de peróxido de hidrogênio (20% do escore total). Para o teste de co-agregação, também foi dado um peso maior para o resultado das bactérias que foram testadas contra um maior número de patógenos, de modo que os isolados testados contra apenas um patógeno não obtivessem a mesma nota que os testados contra quatro caso apresentassem um escore médio de co-agregação semelhante. Os resultados da construção deste escore são apresentados na Tabela 9.

Os resultados demonstram que dentre os onze isolados testados, três apresentam um escore igual ou superior a 8 (isolados 12 *Escherichia*, 27 *Streptococcus* e 41g *Aerococcus*), sendo considerados os principais candidatos a probiótico descritos neste trabalho. Outros três isolados apresentam um valor mediano a alto, igual ou superior a 7 (isolados 19, 30 e 41p), e os outros quatro isolados apresentam um escore mediano a baixo, entre 6,2 e 5,4 (8, 21, 25 e 31), e um isolado (45) apresenta um escore muito baixo (4,8), não sendo recomendado como candidato a probiótico para testes futuros.

O estudo de um microrganismo com potencial probiótico é uma das perspectivas deste trabalho, e dentre os experimentos planejados ou já em andamento estão o sequenciamento do genoma completo destes onze isolados, estudos para caracterização da segurança destas bactérias e testes *in vivo* com camundongos

isentos de germes para medir a capacidade de colonização e proteção destas bactérias.

Isolado		Escore Padronizado			
Identificação	Gênero	Antagonismo	Co-agregação	Peróxido de Hidrogênio	Soma
12	<i>Escherichia</i>	4	2,6	2	8,6
41g	<i>Aerococcus</i>	4	2,5	2	8,5
27	<i>Streptococcus</i>	4	2	2	8
19	<i>Streptococcus</i>	3,2	2,5	2	7,7
30	<i>Escherichia</i>	2,4	2,6	2	7
41p	<i>Cellulosimicrobium</i>	2,4	2,6	2	7
25	<i>Escherichia</i>	4	2,2	0	6,2
21	<i>Escherichia</i>	4	1,8	0	5,8
31	<i>Escherichia</i>	3,2	2,6	0	5,8
8	<i>Escherichia</i>	3,2	2,2	0	5,4
45	<i>Streptococcus</i>	0,8	2	2	4,8

Tabela 9 – Escore padronizado calculado com base nos testes de antagonismo, co-agregação e produção de peróxido de hidrogênio aplicados a cada um dos isolados. A soma representa o total do escore, que varia de 0 a 10.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho visou caracterizar a microbiota do trato geniturinário de fêmeas da raça Nelore, a principal raça de corte no Brasil, investigando dois perfis de desenvolvimento diferentes (novilhas e vacas) e dois perfis hormonais também distintos (prenhes e vazias), utilizando para isso métodos dependentes e independentes de cultivo.

A metagenômica apresentou uma microbiota com grande diversidade de bactérias, e baixa diversidade para arqueias e fungos. As bactérias dominam este trato, e tendem a estar presente em maiores quantidades nos animais vazios, porém apenas em relação ao domínio *Bacteria* como um todo. Investigações nos níveis de filós e gêneros não apontaram uma variação clara nas OTUs dominantes entre novilhas e vacas nem entre prenhes e vazias. Os filós mais abundantes encontrados foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Já os gêneros dominantes estão distribuídos entre muitos grupos, sendo os quatro principais *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus*, que parecem ser influenciados por variações individuais dos animais, possivelmente por diferentes concentrações de oxigênio no trato vaginal, hipótese esta que deverá ser verificada em trabalhos futuros. As arqueias estão presentes em quantidades muito maiores nos animais prenhes, estando quase ausentes nos vazios. O único filo encontrado é *Euryarchaeota*, e o principal gênero, *Methanobrevibacter*. Os eucariotos tendem a aparecer em maiores quantidades nos animais mais velhos (vacas), e não variam significativamente de acordo com o estado hormonal, embora haja uma tendência a uma redução da abundância das OTUs dominantes nos animais prenhes. *Ascomycota* domina dentre os filós, e o gênero *Mycosphaerella* é o principal em todos os grupos analisados. Os resultados apontam para uma microbiota cuja instalação é fortemente influenciada pela proximidade da microbiota do trato gastrointestinal, sem que haja uma ação relevante dos hormônios na evolução da ecologia do trato, seja durante a puberdade ou a prenhez.

Já os dados obtidos com cultura apontam para uma influência dos hormônios para as bactérias isoladas: animais prenhes apresentam taxas de isolamento mais altas que animais vazios, e o mesmo ocorre com vacas em relação às novilhas. Por ser uma técnica menos abrangente e com menor cobertura, é possível que o isolamento seja mais susceptível a alterações pontuais provocadas pela variação nos níveis hormonais dos animais. Mais de 85% dos isolados, contando todas as bactérias de todos os grupos, pertencem ao gênero *Escherichia*. Dentre os isolados neste trabalho, três apresentam bom potencial probiótico, revelado por experimentos de antagonismo, produção de peróxido de hidrogênio e co-agregação, e devem ser mais bem estudados para tornar possível tal aplicação no futuro.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

O estudo de um microrganismo com potencial probiótico para prevenção ou tratamento de infecções urogenitais em bovinos é uma das perspectivas deste trabalho, e dentre os experimentos planejados ou já em andamento estão o sequenciamento do genoma completo destes onze isolados, estudos para caracterização da segurança destas bactérias e testes *in vivo* com camundongos isentos de germes para medir a capacidade de colonização e proteção destas bactérias.

Análises envolvendo técnicas independentes de cultivo devem também ser realizadas no trato vaginal de fêmeas de outras raças bovinas e provenientes de outras fazendas, para investigação da influência do perfil genético e do ambiente na colonização da microbiota saudável do trato vaginal.

Referências bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(ASBIA) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **INDEX ASBIA MERCADO 2014**. Uberaba: ASBIA, 2014.

AHMED, W. M. et al. Vaginal bacterial profile of buffalo-cows in relation to ovarian activity. **Global Veterinaria**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2007.

AMANN, R. I. et al. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.

AMATO, K. R. et al. The gut microbiota appears to compensate for seasonal diet variation in the wild black howler monkey (*Alouatta pigra*). **Microbial Ecology**, v. 69, n. 2, p. 434–443, 2014.

AMIN, J. D.; ZARIA, L. T.; MALGWI, R. M. Vaginal aerobic bacterial flora of apparently healthy cattle in various stages of the reproductive cycle in the Sahel region of Nigeria. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 44, n. 1, p. 15–18, 1996.

ANDRADE, J. B. DE. **Estudo microbiológico e citológico do trato genital de gatas domésticas**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

ANDRADE, J. R. A et al. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 720–725, 2005.

ANTONIO, M. A; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1950–1956, 1999.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2010.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013.

BADRI, M. S. et al. Rectal colonization with group B *Streptococcus*: relation to vaginal colonization of pregnant women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 135, n. 2, p. 308–312, 1977.

BANIK, J. J.; BRADY, S. F. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 603–609, 2010.

BEAGLEY, K. W.; GOCKEL, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 13–22, 2003.

BÉJÀ, O. et al. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 516–529, 2000.

BENTLEY, D. R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 53–59, 2008.

BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: Natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 383–408, 2005.

BORSBERRY, S.; DOBSON, H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 9, p. 217–219, 1989.

BOSKEY, E. R. et al. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5170–5175, 1999.

BOUZALAS, I. G. et al. Neurotropic astrovirus in cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3318–3324, 2014.

BRANCO, K. M. G. R. et al. Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 4, p. 338–344, 2010.

BRASHEARS, M. M. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 5, p. 748–754, 2003.

BROTMAN, R. M. et al. Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: Challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. **Vaccine**, v. 32, n. 14, p. 1543–1552, 2014.

BRULC, J. M. et al. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1948–53, 2009.

BRYANT, M. P. Normal Flora - Rumen Microbiota. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 23, n. 11, p. 1440–1450, 1970.

CARBERRY, C. A. et al. Rumen methanogenic genotypes differ in abundance according to host residual feed intake phenotype and diet type. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 586–594, 2014.

DA SILVA, M. D. C. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria in eucalyptus globulus plantations. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111313, 2014.

DE OLIVEIRA, M. N. V. et al. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 307–314, 2013.

DELONG, E. F. Microbial community genomics in the ocean. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 459–469, 2005.

DHILLON, B. et al. The landscape of transposable elements in the finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1132, 2014.

DIAZ-TORRES, M. L. et al. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1430–1432, 2003.

DOHMEN, M. J. W. et al. The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1379–1388, 1995.

DOWD, S. E. et al. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 125, 2008.

DRILLICH, M. et al. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2010–2017, 2001.

DUMONCEAUX, T. J. et al. Multiplex detection of bacteria associated with normal microbiota and with bacterial vaginosis in vaginal swabs by use of oligonucleotide-coupled fluorescent microspheres. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4067–4077, 2009.

ECKHAUT, V. et al. *Butyricoccus pullicaecorum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2799–2802, 2008.

ECKHAUT, V. et al. *Butyricoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1745–52, 2013.

ELAD, D. et al. Bovine necrotic vulvovaginitis associated with *Porphyromonas levii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 505–507, 2004.

ELAZHARY, M. A. et al. *Bovine herpesvirus type 1* in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 12, p. 336–9, 1980.

EL-SAID, A. H. M.; SALEEM, A. Ecological and physiological studies on soil fungi at Western Region, Libya. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2008.

GACI, N. et al. *Archaea* and the human gut: New beginning of an old story. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 43, p. 16062–16078, 2014.

GAJER, P. et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 132, p. 132–152, 2012.

GALBRAITH, E. A; ANTONOPOULOS, D. A; WHITE, B. A. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 928–37, 2004.

GALON, N.; ZERON, Y.; EZRA, E. Factors affecting fertility of dairy cows in Israel. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 56 Suppl, p. S8–14, 2010.

GANI, M. et al. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 6, n. 1, p. 79–86, 2008.

GARCÍA-GÓMEZ, E.; GONZÁLEZ-PEDRAJO, B.; CAMACHO-ARROYO, I. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GAUTAM, G.; NAKAO, T. Prevalence of urovagina and its effects on reproductive performance in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1451–1461, 2009.

GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G. I.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Microbial cell surface hydrophobicity. The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). **Journal of Microbiological Methods**, v. 18, n. 1, p. 61–68, 1993.

GEWOLB, I. H. et al. Stool microflora in extremely low birthweight infants. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 80, n. 3, p. F167–F173, 1999.

GIACAMAN, R. A et al. *Porphyromonas gingivalis* induces CCR5-dependent transfer of infectious HIV-1 from oral keratinocytes to permissive cells. **Retrovirology**, v. 5, p. 29, 2008.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, 2006.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 648–54, 2006.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 504–7, 2008.

GOMES, M. C. **Microbiota vaginal de cabras nas fases do proestro, pós-cópula e pós-parto**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

GRÖHN, Y. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 605–14, 2000.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HAUSE, B. M. et al. Bovine rhinitis viruses are common in U.S. cattle with bovine respiratory disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121998, 2015.

HEALY, F. G. et al. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 667–674, 1995.

HEINEMANN, C.; REID, G. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 777–781, 2005.

HENNE, A. et al. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3113–3116, 2000.

HERTHELIUS, M. et al. Elimination of vaginal colonization with *Escherichia coli* by administration of indigenous flora. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2447–2451, 1989.

HRISTOV, A. N. et al. Rumen bacterial, archaeal, and fungal diversity of dairy cows in response to lauric or myristic acids ingestion. **Journal of Animal Science**, p. 4449–4457, 2012.

JENTSCH, H. F. R.; MÄRZ, D.; KRÜGER, M. The effects of stress hormones on growth of selected periodontitis related bacteria. **Anaerobe**, v. 24, p. 49–54, 2013.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com Reproductive failures in beef cattle breeding herds with emphasis for infectious causes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 289–298, 2006.

KHELAIPIA, S. et al. Draft genome sequencing of *Methanobrevibacter oralis* strain JMR01, isolated from the human intestinal microbiota. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, p. e00073–14, 2014.

KIM, I.-H.; KANG, H.-G. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 49, n. 6, p. 485–91, 2003.

KIM, M. et al. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 683–694, 2014.

KIRKBRIDE, C. A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 2, p. 175–80, 1992a.

KIRKBRIDE, C. A. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 4, p. 374–9, 1992b.

KLEESSEN, B.; BLAUT, M. Modulation of gut mucosal biofilms. **The British Journal of Nutrition**, v. 93 Suppl 1, p. S35–S40, 2005.

KNUDSEN, L. R. V. et al. Revisiting bovine pyometra—New insights into the disease using a culture-independent deep sequencing approach. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 2-4, p. 319–324, 2015.

KO, K. C. et al. A novel multifunctional cellulolytic enzyme screened from metagenomic resources representing ruminal bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 3, p. 567–572, 2013.

KOITER, T. R.; HAZENBERG, M. P.; VAN DER SCHOOT, P. Regulation of the bacterial microflora of the vagina in cyclic female rats. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 202, n. 1, p. 121–128, 1977.

KOPEČNÝ, J. et al. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 201–209, 2003.

KOTARSKI, S. F.; SAVAGE, D. C. Models for study of the specificity by which indigenous lactobacilli adhere to murine gastric epithelia. **Infection and Immunity**, v. 26, n. 3, p. 966–975, 1979.

KRULL, A. C. et al. Deep sequencing analysis reveals the temporal microbiota changes associated with the development of bovine digital dermatitis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3359–3373, 2014.

KUMMER, V. et al. Stimulation of cell defense mechanism of bovine endometrium by temporal colonization with selected strains of lactobacilli. **Veterinarni Medicina**, v. 42, n. 8, p. 217–224, 1997.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many

geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3614–3621, 1997.

LAGENAUR, L. A. et al. Demonstration of vaginal colonization with GusA-expressing *Lactobacillus jensenii* following oral delivery in rhesus macaques. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 10, p. 1006–1010, 2011.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 20, p. 6955–9, 1985.

LARSEN, A. et al. Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 85, n. 3, p. 483–494, 2013.

LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1610–1618, 2011.

LEE, J. H. et al. Genome sequence of *Methanobrevibacter* sp. strain jh1, isolated from rumen of Korean native cattle. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, p. 2009–2010, 2013.

LEINBACH, S. S. et al. Mechanism of phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase. **Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 426–430, 1976.

LI, L. et al. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. 1385–1392, 2013.

LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. Article ID 251364, p. 11 pages, 2012.

LOMAN, N. J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 434–439, 2012.

MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H.; ALLISON, C. Protein degradation by human intestinal bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 1647–1656, 1986.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 2021–8, 2014.

MARKUSFELD, O. Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 1, p. 158–166, 1987.

MATH, R. K. et al. Isolation of a novel gene encoding a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme from a cow rumen metagenomic library. **Biodegradation**, v. 21, n. 4, p. 565–73, 2010.

MCCANN; LOOR, J.; WICKERSHAM, T. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 8, p. 109–125, 2014.

MCDONALD, M. C.; MCDONALD, B. A.; SOLOMON, P. S. Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*-wheat interaction: insights from pathogenomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 102, 2015.

MCGRATH, K. C. et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 172–6, 2008.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylo-genetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 386, 2008.

MIÑANA-GALBIS, D. et al. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1600–1604, 2010.

MORENO, E. et al. Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mucosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 835–840, 2011.

MORENO SWITT, A. I. et al. Genomic comparison of sporeforming bacilli isolated from milk. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 26, 2014.

MSHELIA, G. D. et al. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: Geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, 2010.

NANDASENA, K. et al. Complete genome sequence of *Mesorhizobium ciceri* bv. biserrulae type strain (WSM1271T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 9, n. 3, p. 462–472, 2014.

NELSEN, T. C. et al. Nonpuberal estrus and mature cow influences on growth and puberty in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 2, p. 470–473, 1985.

NG, T. F. F. et al. A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. **Journal of Virology**, p. [Published ahead of print], 2015.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L. P.; COELHO, L. G. V (Eds.). . **Gastroenterologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004. p. 1037–1047.

NOCEK, J. E.; KAUTZ, W. P. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 260–266, 2006.

OIKONOMOU, G. et al. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.

OLIVEIRA, L. J. et al. Modulation of maternal immune system during pregnancy in the cow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. Suppl.4, p. 384–393, 2012.

OPSOMER, G. et al. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 841–857, 2000.

OTERO, C. et al. Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. **Anaerobe**, v. 5, n. 3, p. 305–307, 1999.

OTERO, C. et al. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 251–254, 2000.

OTERO, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1-2, p. 35–46, 2006.

PATEL, V. et al. Characterization of the rumen microbiome of Indian Kankrej cattle (*Bos indicus*) adapted to different forage diet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9749–9761, 2014.

PELLEGRIN, A. O. et al. **Coleta de material para diagnóstico das doenças infecciosas que interferem com a reprodução de bovinos. Circular Técnica 45.** Corumbá: EMBRAPA, 2003.

PELZER, E. S. et al. Hormone-dependent bacterial growth, persistence and biofilm formation - a pilot study investigating human follicular fluid collected during IVF cycles. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2012.

PEREIRA, C. B. et al. Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **The Journal of Antibiotics**, p. [Published ahead of print], 2015.

PETRI, R. M. et al. Subcutaneous adipose fatty acid profiles and related rumen bacterial populations of steers fed red clover or grass hay diets containing flax or sunflower-seed. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104167, 2014.

QUAIL, M. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012.

RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3260–3264, 2003.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. Suppl 1, p. 4680–4687, 2011.

REID, G. et al. Prevention of urinary tract infection in rats with an indigenous *Lactobacillus casei* strain. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 2, p. 320–324, 1985.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3763, 1999.

REID, G. et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: Randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 131–134, 2003.

RETI, K. L. et al. Effect of antimicrobial growth promoter administration on the intestinal microbiota of beef cattle. **Gut Pathogens**, v. 5, p. 8, 2013.

ROCHA, A. A. et al. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 215–220, 2004.

RODRÍGUEZ, C. et al. Lactobacilli isolated from vaginal vault of dairy and meat cows during progesteronic stage of estrous cycle. **Anaerobe**, v. 17, n. 1, p. 15–18, 2011.

RONDON, M. R. M. R. et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 2000.

ROSENBERG, M.; JUDES, H.; WEISS, E. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 2, p. 831–834, 1983.

RUAN, A. et al. Effect of low concentration 17 β -estradiol on the emissions of CH₄ and CO₂ in anaerobic sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2672–7, 2013.

SANTOS, A. G. DOS. **Avaliação da microbiota vaginal de cadelas usando como diagnóstico o isolamento microbiológico e a colpocitologia**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 107–133, 1977.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Glycerol monolaurate does not alter rhesus macaque (*Macaca mulatta*) vaginal lactobacilli and is safe for chronic use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4448–4454, 2008.

SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Microbiology**, v. 173, n. 14, p. 4371–4378, 1991.

SEVIM, E. et al. DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* and *Aeribacillus pallidus* AC6 σ D proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 2, p. 575–579, 2011.

SHANKS, O. C. et al. Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4054–60, 2006.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–30, 2006.

SHELDON, I. M. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 115–21, abr. 2008.

SHELDON, I. M. et al. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44 Suppl 3, p. 1–9, 2009.

SIJPESTEIJN, A. K. On *Ruminococcus flavefaciens*, a cellulose-decomposing bacterium from the rumen of sheep and cattle. **Journal of General Microbiology**, v. 5, n. 5 Suppl., p. 869–879, 1951.

SILVA, V. F. et al. Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças e sua susceptibilidade aos antibióticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 586–590, 2011.

SINGH, J. et al. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 3, p. 301–9, 2008.

SINGH, J. et al. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 480–94, 2009.

SNELLING, T. J. et al. Diversity and community composition of methanogenic archaea in the rumen of scottish upland sheep assessed by different methods. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106491, 2014.

ST JEAN, G. et al. Urethral extension for correction of urovagina in cattle. A review of 14 cases. **Veterinary surgery**, v. 17, n. 5, p. 258–262, 1988.

STEIN, D. R. et al. Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 111–125, 2006.

STEIN, J. L. et al. Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 591–599, 1996.

TASSE, L. et al. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. **Genome Research**, v. 20, n. 11, p. 1605–1612, 2010.

TROWER, M. K. et al. Isolation and characterization of a cyclohexane-metabolizing *Xanthobacter* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1282–1289, 1985.

TSURUMARU, H. et al. Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 1, p. 63–69, 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Livestock and poultry: World markets and trade**, 2014.

VAN GYLSWYK, N. O.; HIPPE, H.; RAINEY, F. A. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 559–563, 1996.

VAN OIRSCHOT, J. T. et al. Virulence and genotype of a *Bovine herpesvirus 1* isolate from semen of a subclinically infected bull. **The Veterinary Record**, v. 137, n. 10, p. 235–239, 1995.

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 131–43, 2000.

VILLARREAL, D. T.; TURCO, R. F.; KONOPKA, A. Propachlor degradation by a soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2135–2140, 1991.

WAGNER, R. D. et al. Bovine intestinal bacteria inactivate and degrade ceftiofur and ceftriaxone with multiple β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4990–4998, 2011.

WEINSTEIN, L. The Bacterial flora of the human vagina. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 10, n. 3, p. 247–260, 1938.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 1998.

WILLIAMS, E. J. et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 102–117, 2005.

WRATHALL, A E.; SIMMONS, H. A; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247–74, 2006.

YAEGER, M. J. et al. The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 3, p. 268–73, 1998.

YOUNTS-DAHL, S. M. et al. Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 6–10, 2005.

ZENED, A. et al. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 2, p. 504–514, 2013.

ZHANG, S. et al. Changes in bacterial community of anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 12, n. 9, p. 760–768, 2011.

ZIEMER, C. J. Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eight-week continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 574–585, 2014.

ZILLIG, W. Comparative biochemistry of *Archaea* and *Bacteria*. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 1, n. 4, p. 544–551, 1991.

Perfil hormonal durante o ciclo estral. Universidade Federal Fluminense. Disponível em: <<http://www.uff.br/webvideoquest/MN/LM18.htm>>. Acesso em 15/04/2015.