

Telma Maria Alves

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES SEMELHANTES AO *TOLL* NA INDUÇÃO DE EXPRESSÃO DE mRNA PARA CXCL8 (IL-8) NA INFECÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS EPITELIAIS POR *CAMPYLOBACTER FETUS* SUBSP. *VENEREALIS* E *TRITRICHOMONAS FOETUS*

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Professor Dr. Andrey Pereira Lage

Co-orientadores: Dr. Renato de Lima Santos
Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2010

A474p Alves, Telma Maria, 1977-

Participação dos receptores semelhantes ao *Toll* na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção *in vitro* de células epiteliais por *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis* e *Tritrichomonas foetus* / Telma Maria Alves. – 2010.

61p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage

Co-orientadores: Renato de Lima Santos, Zélia Inês Portela Lobato

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

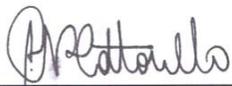
1. Bovino – Doenças – Teses. *Campylobacter* – Teses. 3. Tricomonose - Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Santos, Renato de Lima. III. Lobato, Zélia Inês Portela. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 96

Tese defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Andrey Pereira Lage
Orientador



Profª. Ana Cláudia Pinto Cottorello



Prof. Marcos Bryan Heinemann



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



Profª. Ana Paula Reinato Stynen

Dedico esta conquista a minha família!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Jair (*in memóriam*) e Neusa que caminharam lado a lado, na minha formação: o meu muito obrigado. Pai: mesmo não estando mais com a gente nestes últimos momentos, pude sentir sua presença constante nos meus pensamentos, foi fundamental. Peço desculpas pela minha ausência e em troca recebi apoio, amor, amizade e forças para suportar a distância e esse mundo novo de conhecimento. Vocês ajudaram muito nesta conquista.

A você Rimã (Regina) querida, que sempre acreditou em mim, me apoiando em todos os momentos da minha jornada.

Ao Prof. Andrey, meu mestre, meu amigo e muitas vezes meu porto seguro. Quero agradecer pela oportunidade, carinho, confiança e ensinamentos concedidos, por acreditar em mim e me dar essa oportunidade de seguir os meus sonhos;

Aos grandes amigos e amigas do Laboratório de Bacteriologia Aplicada: Ana Paula (Poia), Karina, Ana Cláudia, Monalisa, Rebeca, Juliana, Thiago, Silvia, Elaine, Jordana, Giovanna, Karinão, Ethienne, Abel, Adriano que fizeram parte do meu dia a dia, dos trabalhos, boas conversas, trocas de experiências e até colo;

A todos os amigos: Nádia, Eduardo, Mirli, Fábria, Nilda, Doris, Graziela e Nelson. A todos os funcionários e professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial aos professores: Marcos, Zélia, Renato, Jenner, Alan pelas ajudas concedidas;

A Fapemig pelo financiamento do projeto para execução dos trabalhos.

A Capes, pela concessão da bolsa;

A FEP-MVZ pelo apoio financeiro e infra-estrutura para realização dos experimentos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO 1 - CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA E TRICOMONOSE GENITAL BOVINA	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 ETIOLOGIA	13
3 DISTRIBUIÇÃO DA CGB E DA TGB	13
4 TRANSMISSÃO	16
5 PATOGENIA.....	16
6 FATORES DE RISCO.....	16
7 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	17
8 RESPOSTA IMUNE INATA.....	18
9 IMUNIDADE ADAPTATIVA.....	20
10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	21
11 CONTROLE.....	24
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 2 - CAMPYLOBACTER FETUS SUBSP. VENEREALIS ESTIMULA A PRODUÇÃO DE MRNA PARA CXCL8 VIA TLR2	34
RESUMO	35
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 Amostra bacteriana	37
2.2 Linhagens celulares	37
2.3 Perfil de expressão de TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 em células epiteliais.....	37
2.4 Infecção das linhagens celulares	38
2.5 Extração de RNA e confecção de cDNA.....	38
2.6 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)	38
2.7 Análises estatísticas	39
3 RESULTADOS	40
3.1 Perfil de expressão TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 em células epiteliais.....	40
3.2 Expressão de mRNA para CXCL8 nas linhagens celulares HeLa e HEK293 infectadas por <i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i> P3.....	40
3.3 Expressão de mRNA para CXCL8, TLR4 e TLR5 em células MDBK infectadas com <i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i> P3	41
3.4 Expressão de mRNA para CXCL8 em células HEK293 e HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 infectadas com <i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i> P3.....	42
4 DISCUSSÃO	42
5 CONCLUSÕES	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

	CAPÍTULO 3 - TRITRICHOMONAS FOETUS ESTIMULA A PRODUÇÃO DE MRNA PARA CXCL8 VIA TLR4/MD-2.....	46
	RESUMO.....	47
	ABSTRACT.....	47
1	INTRODUÇÃO.....	48
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1	Cultivo do protozoário.....	49
2.2	Cultivos das linhagens celulares.....	49
2.3	Perfil de expressão de TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 em células epiteliais.....	49
2.4	Determinação da multiplicidade de infecção (MOI) e tempos para ensaios de expressão mRNA para CXCL8 e TLR em células epiteliais infectadas com <i>T. foetus</i>	50
2.5	Infeções das linhagens celulares.....	50
2.6	Extração de RNA e confecção de cDNA.....	50
2.7	RT-PCR quantitativo (qRT-PCR).....	50
2.8	Análises estatísticas.....	51
3	RESULTADOS.....	52
3.1	Efeito da multiplicidade de infecção (MOI) para ensaios de expressão mRNA para CXCL8 em células epiteliais infectadas com <i>T. foetus</i>	52
3.2	Expressão de receptores semelhantes a <i>Toll</i> (TLR) e molécula acessória MD-2 em células epiteliais.....	52
3.3	Determinação da multiplicidade de infecção (MOI) para ensaios de expressão de mRNA para CXCL8 e TLR em células epiteliais infectadas com <i>T. foetus</i>	52
3.4	Expressão de mRNA para CXCL8 em linhagem celular HeLa infectadas com <i>T. foetus</i>	52
3.5	Expressão de mRNA para CXCL8 nas linhagens celulares HeLa e HEK293 infectada com <i>T. foetus</i>	53
3.6	Expressão de mRNA para CXCL8, TLR4 e TLR5 em linhagem celular MDBK infectadas com <i>T. foetus</i>	55
3.7	Expressão de mRNA para CXCL8 em célula HEK293, HEK293-TLR2 e HEK293-TLR4/MD-2 infectadas com <i>T. foetus</i>	55
4	DISCUSSÃO.....	55
5	CONCLUSÕES.....	57
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE TABELAS		
CAPÍTULO 1 - CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA E TRICOMONOSE GENITAL BOVINA		
Tabela 1	Campilobacteriose Genital Bovina em bovinos no Brasil, de 1956 a 2009	15
Tabela 2	Tricomonose Genital Bovina em bovinos no Brasil, de 1953 a 2009	15
CAPÍTULO 2 - <i>CAMPYLOBACTER. FETUS</i> SUBSP. <i>VENEREALIS</i> ESTIMULA A PRODUÇÃO DE MRNA PARA CXCL8 VIA TLR2		
Tabela 1	Iniciadores utilizados para análise da qRT-PCR	39
Tabela 2	Linhagens celulares e seus respectivos <i>Toll-like</i> receptors expressos e molécula acessória MD-2.....	40
CAPÍTULO 3 <i>TRITRICHOMONAS FOETUS</i> ESTIMULA A PRODUÇÃO DE MRNA PARA CXCL8 VIA TLR4/MD-2		
Tabela 1	Iniciadores utilizados para análise da qRT-PCR.....	51
Tabela 2	Linhagens celulares e seus respectivos <i>Toll-like receptors</i> expressos e molécula acessória MD-2.....	52

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS		
CAPÍTULO 1 - CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA E TRICOMONOSE GENITAL BOVINA		
Figura 1	Distribuição da campilobacteriose genital bovina, segundo a OIE julho-dezembro de 2009. Fonte: OIE – World Organization for Animal Health, 2009...	14
Figura 2	Distribuição da tricomonose genital bovina, segundo a OIE julho-dezembro de 2008. Fonte: OIE – World Organization for Animal Health, 2009	14
CAPÍTULO 2 - <i>CAMPYLOBACTER. FETUS</i> SUBSP. <i>VENEREALIS</i> ESTIMULA A PRODUÇÃO DE MRNA PARA CXCL8 VIA TLR2		
Gráfico 1	Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células HeLa e HEK293 com <i>Campylobacter fetus</i> subps. <i>venerrealis</i> com a multiplicidade de infecção de 500 bactérias/célula	40
Gráfico 2	Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção de células MDBK com <i>Campylobacter fetus</i> subps. <i>venerrealis</i> com a multiplicidade de infecção de 500 bactérias/célula	41
Gráfico 3	Expressão de mRNA para TLR4 e TLR5 após infecção de células MDBK com <i>Campylobacter fetus</i> subps. <i>venerrealis</i> com a multiplicidade de infecção de 500 bactérias/célula	41

Gráfico 4	Expressão de mRNA para CXCL8 em células HEK293, HEK293-TLR2, HEK-293-TLR4/MD-2 após infecção com <i>Campylobacter fetus</i> subps. <i>venerealis</i> com a multiplicidade de infecção de 500 bactérias/célula	42
-----------	---	----

CAPÍTULO 3 TRITRICHOMONAS FOETUS ESTIMULA A PRODUÇÃO DE MRNA PARA CXCL8 VIA TLR4/MD-2

Gráfico 1	Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células HeLa com <i>Tritrichomonas foetus</i> com uma multiplicidade de infecção de 5 protozoários/célula.	53
-----------	---	----

Gráfico 2	Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células HEK293 e HeLa com <i>Tritrichomonas foetus</i> com a multiplicidade de infecção de 0,05 protozoário/célula	54
-----------	--	----

Gráfico 3	Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células MDBK com <i>Tritrichomonas foetus</i> com uma multiplicidade de infecção de 5 protozoários/célula	54
-----------	---	----

Gráfico 4	Expressão de mRNA para TLR4 e TLR5 após infecção com <i>Tritrichomonas foetus</i> em células MDBK com uma multiplicidade de infecção de 5 protozoários/célula	55
-----------	---	----

Gráfico 5	Expressão de mRNA para CXL8 em células HEK293, HEK293-TLR2, HEK-293-TLR4/MD-2 após infecção com <i>Tritrichomonas foetus</i> com uma multiplicidade de infecção de 0,05 protozoário/célula.	56
-----------	--	----

RESUMO GERAL

O presente trabalho aborda duas das mais importantes doenças sexualmente transmitidas de bovinos, a campilobacteriose genital bovina e a tricomonose genital bovina causadas pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e pelo *Tritrichomonas foetus*, respectivamente. O primeiro capítulo contém uma revisão de literatura sobre as duas enfermidades na qual são abordados aspectos relacionados à epidemiologia, diagnóstico, medidas de controle, distribuição, fatores de risco e imunidade. Estudos *in vitro* sobre a interação entre *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* com células epiteliais são apresentados no segundo e terceiro capítulos, respectivamente. A cinética de transcrição de CXCL8 pelos microrganismos foram avaliadas usando as linhagens epiteliais HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 por qRT-PCR após realização de cinética de infecção com os iniciadores específicos para CXCL8, TLR2, TLR4, MD-2. Neste estudo, a amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, previamente ativada por três passagens em novilhas virgens, foi capaz de induzir a transcrição de CXCL8 via TLR2 após 6h em células epiteliais indicando a participação desta quimiocina na resposta imune inicial contra o microrganismo. A amostra de *T. foetus* isolada de trato genital de fêmea bovina foi capaz de induzir a expressão de CXCL8 via TLR4/MD-2 após 18h de infecção. Em ambas as enfermidades a resposta humoral está bem definida, entretanto, é necessário a compressão da resposta imune inata á essas infecções, o que poderá propiciar um avanço no conhecimento da imunidade de mucosas no trato genital e contribuir para o maior conhecimento das patogenias.

Palavras chave: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Tritrichomonas foetus*, CXCL8, campilobacteriose genital bovina, tricomonose genital bovina, imunidade inata.

ABSTRACT

The present study is about two of the most important sexually transmitted diseases in cattle, bovine genital campylobacteriosis and bovine genital trichomoniasis caused by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and by *Tritrichomonas foetus* respectively. In the first chapter, there is a literature review of the two diseases, focusing on aspects related to epidemiology, diagnosis, control measures, distribution, risk factors and immunity. In the second and third chapters, we studied the interaction of *C. fetus* subsp. *venerealis* and *T. foetus* with epithelial cells *in vitro* respectively. The kinetics of CXCL8 transcription in microorganisms were evaluated by RT-PCR using epithelial cells: HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2, after infection kinetics, with the use of specific primers for CXCL8, TLR2, TLR4, MD-2. In this study, the *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T strain, previously activated by three passages in virgin heifers, was able to induce the expression of CXCL8 via TLR2 in epithelial cells after 6 h indicating the involvement of this chemokine in the initial immune response against the organism. *T. foetus* isolated from bovine female genital tract was able to induce the transcription of CXCL8 via TLR4/MD-2 18 h after infection. In both diseases the humoral response is well defined, however, is needed to compress the innate immune response, which will provide a better understanding of the mucosal immunity in the genital tract, contributing to a greater knowledge of the pathogenesis.

Key words: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *Tritrichomonas foetus*, CXCL8, innate immunity

CAPÍTULO 1

CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA E TRICOMONOSE GENITAL BOVINA

1 - INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) e a tricomonose genital bovina (TGB) são doenças infecto-contagiosas de transmissão sexual, que acometem bovinos em idade reprodutiva e causam grandes perdas econômicas em decorrência dos problemas reprodutivos desencadeados (Dekeyser, 1984; Goodger e Skirrow, 1986). Podem causar morte embrionária, repetição de cios, abortos, vacas vazias no final da estação de monta, ocasionando a necessidade de maior frequência na reposição de touros, aumento do período entre partos e, conseqüentemente, queda na produção de bezerros nascidos e produção de leite (Leite, 1977; Pellegrin *et al.*, 1998).

As características epidemiológicas e clínicas, as alterações dos índices zootécnicos e as principais estratégias de controle da infecção causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (*C. fetus* subsp. *venerealis*) e pelo *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*), são muito semelhantes, o que permite que vários aspectos da infecção e das doenças possam ser discutidos conjuntamente. No entanto, algumas particularidades, principalmente relacionadas à patogenia das doenças, devem ser individualizadas para que se possa ter maior compreensão do processo infeccioso.

2 - ETIOLOGIA

C. fetus possui duas subespécies, subsp. *fetus*, que causa aborto esporádico em bovinos e infertilidade enzoótica em ovinos, e *C. fetus* subsp. *venerealis*, causador da CGB. *C. fetus* subsp. *venerealis* é um bastonete Gram-negativo, espiralado, em forma de vírgula ou em "S", possui um ou dois flagelos polares e não forma esporos. É microaerófilo, necessitando de atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento (Vandamme, 2000). *C. fetus* é classificado em dois sorotipos denominados A e B, com base na composição do lipopolissacarídeo da membrana externa da bactéria, sendo que *C. fetus* subsp. *fetus* apresenta ambos os

sorotipos (A e B), enquanto *C. fetus* subsp. *venerealis* apresenta somente o sorotipo A (Thompson e Blaser, 2000).

T. foetus é um protozoário piriforme, anaeróbio facultativo, possui axóstilo que da sustentação ao corpo e que se estende de uma ponta a outra, dando rigidez ao microrganismo. Possui três flagelos anteriores, um quarto flagelo posterior e uma membrana ondulante (Skirrow e BonDurant, 1988). Pode se apresentar na forma de trofozoito ou pseudocisto, sendo que o pseudocisto se refere à transformação morfológica em forma compactada, imóvel (Granger *et al.*, 2000). Os sorotipos de *T. foetus* descritos, Brisbane, Belfast, e Manley, foram estabelecidos utilizando-se aglutinação, hemaglutinação passiva e testes cutâneos e todos possuem potencial patogênico (Rae e Crews, 2006).

3 - DISTRIBUIÇÃO DA CGB E TGB

A CGB e a TGB possuem distribuição mundial, tendo sido detectadas em vários países. Dados recentes da OIE mostram a sua presença em países como África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Estados Unidos da América, França, Inglaterra e Nova Zelândia, dentre outros (OIE 2009) (Fig. 1 e 2). Geralmente, áreas que utilizam a monta natural como estratégia reprodutiva de bovinos possuem alta prevalência de CGB e TGB (Lage, 2001; BonDurant, 2005).

No Brasil, a CGB e TGB possivelmente estão presentes em todos os estados da federação em função das práticas de manejo reprodutivo utilizadas no país. A CGB foi diagnosticada pela primeira vez no país em 1955 no Estado de São Paulo por D'Ápice (1956) (Quadro 1). Já para a TGB, o primeiro relato no Brasil foi em 1948 por Roehe no Estado do Rio Grande do Sul (Quadro 2). Desde então, vários relatos de suas ocorrências foram realizados nos diferentes estados do país. Quando tipificados fenotípica e molecularmente, a maioria dos isolados de *C. fetus* de abortos ou problemas reprodutivos em bovinos foi classificada como *C. fetus* subsp.

venerealis (Vargas *et al.*, 2003). A prevalência da CGB em bovinos de corte foi estimada em 2000, nos 12 estados com a maior produção de bovinos do país, em 19,7% (IC 95%: 13,3%; 25,1%) de animais infectados e em 50,8% (IC 95%: 41,6%; 60,1%) de propriedades contaminadas (Miranda, 2005). Entretanto, ambas as doenças permanecem subnotificadas no

Brasil. A ausência de diagnóstico sistemático em todo o país, associado às dificuldades de envio e análise laboratorial de amostras clínicas e ao pequeno número de laboratórios com capacidade técnica para a realização do diagnóstico destas doenças fazem com que a real situação da CGB e TGB permaneça desconhecida da maioria dos técnicos e proprietários.

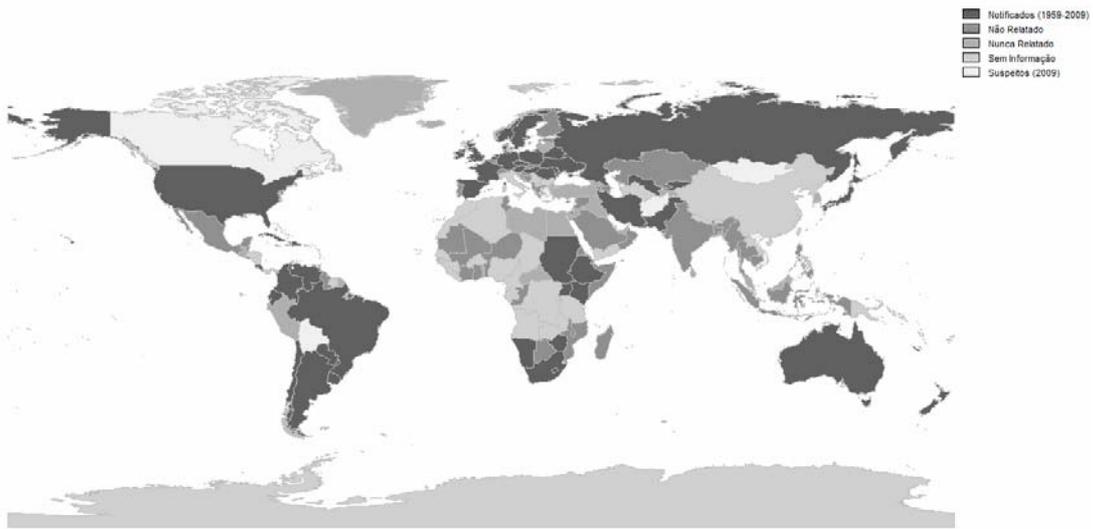


Figura 1 - Distribuição da campilobacteriose genital bovina, segundo a OIE julho - dezembro de 2009.

Fonte: OIE – World Organization for Animal Health, 2009.

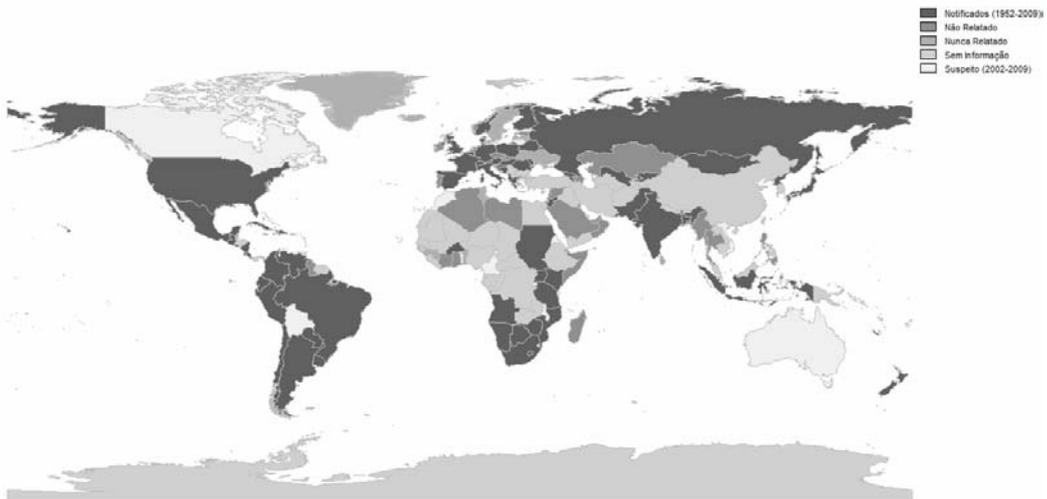


Figura 2 - Distribuição da tricomonose genital bovina, segundo a OIE julho - dezembro de 2009.

Fonte: OIE – World Organization for Animal Health, 2009.

Tabela 1 - Campilobacteriose genital bovina no Brasil, de 1956 a 2009.

Ano	Estado ¹	Autores	Método de diagnóstico ²	Frequência (%)
1955	SP	D'Apice (1956)	I	Primeiro relato
1960 - 1961	RJ	Guida <i>et al.</i> (1960)	MA	3,5
1960	RS	Mies Filho (1960)	MA	27,0
1963	RS	Mies Filho (1963)	MA	53,8
1967	SP	Castro <i>et al.</i> (1967)	MA	8,2
1971	PR, RS, MG	Castro <i>et al.</i> (1971)	MA	8,0
1976	BA	Costa (1976)	MA	66,9
1974 a 1977	MG	Leite (1977)	IFD	28,9
1969 a 1976	RJ	Ramos e Guida (1978)	MA	12,0
1986	SP	Genovez <i>et al.</i> (1986)	I	23,9
1976 a 1996	MG	Lage <i>et al.</i> (1997)	IFD	27,9
1995 a 1996	MS	Pellegrin <i>et al.</i> (2002)	IFD	52,3
1996 a 1997	MG	Jesus <i>et al.</i> (1999)	MA	46,9
1996 a 1997	RJ	Jesus <i>et al.</i> (1999)	MA	22,3
1996 a 1997	MG	Jesus <i>et al.</i> (1999)	I	16,7
1996 a 1997	RJ	Jesus <i>et al.</i> (1999)	I	42,3
1998	MG	Stynen <i>et al.</i> (2003)	IFD	25,5
2000	BA, GO, MA, MT, MS, MG, PA, PR, RS, RO, SP e TO	Miranda (2005)	IFD	19,7
2009	RJ	Rocha <i>et al.</i> (2009)	IFD/I	35,9

Fonte: Lage, 2001, modificada.

1 - BA - Bahia, GO - Goiás, MA - Maranhão, MT - Mato Grosso, MS - Mato Grosso do Sul, MG - Minas Gerais, PA - Pará, PR - Paraná, RJ - Rio de Janeiro, RS - Rio Grande do Sul, RO - Rondônia, SP - São Paulo e TO - Tocantins
2 - IFD - Imunofluorescência direta, MA - Muco - aglutinação, I- isolamento

Tabela 2 - Tricomose genital bovina no Brasil, de 1953 a 2009.

Ano	Estado ^a	Autores	Método de diagnóstico ^b	Índice (%)
1947	RS	Roehe (1948)	-	Primeiro relato
1953-1954	CE, PB, PE, BA, RJ	Mello (1954)	I	7,3-9,0
1963	MG	Megale (1963)	I	Primeiro relato em MG
1970	SP	Amaral <i>et al.</i> (1970)	I	8,0
1971	MG	Medeiros & Figueiredo (1971)	I	14,4
1981	PB	Bacalhau (1981)	I	27
1991	RS	Gomes <i>et al.</i> (1991)	I	1,88
1958-2001	RJ	Jesus <i>et al.</i> (2004)	I	29
1997	MG	Leite <i>et al.</i> (1997)	I	5,9
2009	RJ	Rocha <i>et al.</i> (2009)	I	0

1 - CE - Ceará, BA - Bahia, MG - Minas Gerais, PB - Paraíba, RJ - Rio de Janeiro, PE - Pernambuco, SP - São Paulo e RS - Rio Grande do Sul

2 - Método de diagnóstico - I- isolamento

4 - TRANSMISSÃO

A transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* e do *T. foetus* se dá por via sexual e as fêmeas se infectam após a cópula com touro infectado ou vice-versa, quando ocorre infecção em quase 100% dos casos. A principal forma de introdução da CGB e da TGB em um rebanho é pela aquisição de touros ou vacas infectados (Clark, 1971; Stoessel, 1982; Lage e Leite, 2000). Outras formas de infecção sexual são via sêmen contaminado e comportamento homossexual de touros, o que permite a transmissão de macho a macho. Transmissão por fômites – espéculos, material utilizado na coleta de sêmen e inseminação artificial, camas utilizadas em criações com alta densidade – também pode ocorrer, porém são menos frequentes, (Wagner *et al.*, 1965; Eaglesome e Garcia 1997; Lage e Leite, 2000).

5 – PATOGENIA

No touro, o *C. fetus* subsp. *venerealis* e o *T. foetus* localiza-se na cavidade prepucial, multiplicando-se nas glândulas penianas, não provocando lesões e nem causando alterações na qualidade do sêmen. Touros mais velhos possuem criptas prepuciais mais profundas propiciando um nicho ecológico ideal para a manutenção dos microrganismos no hospedeiro (Clark, 1971; Eaglesome e Garcia, 1992). A eliminação espontânea do agente durante a infecção ocorre raramente, portanto, são portadores assintomáticos e tornando-se disseminadores da infecção.

Nas fêmeas, o *C. fetus* subsp. *venerealis* e o *T. foetus* colonizam o trato genital, após serem depositados na vagina durante a cópula. O primeiro passo para o estabelecimento da infecção é a ligação do microrganismo no epitélio da mucosa vaginal, cérvix e útero. A colonização do útero é a mais importante no desenvolvimento da doença, pois é neste local que a inflamação levará à perda embrionária e repetição de cio (Dekeyser, 1984; Pellegrin e Leite, 2003).

Dozsa *et al.* (1960) estudaram as alterações histológicas que ocorrem no útero de vacas durante o período de infecção com *C. fetus* subsp. *venerealis*. Verificou-se que as mudanças histológicas na mucosa uterina tiveram início após o 5º dia de infecção, ficando mais pronunciadas entre o 15º e o 20º dia e atingindo o pico entre 30 e 60 dias. As lesões incluem destacamento do epitélio com infiltração de neutrófilos e linfócitos, degeneração do epitélio glandular e congestão (Corbeil *et al.*, 1975).

Já o *T. foetus* na fêmea causa vaginite moderada podendo causar piometra. Histologicamente ocorre a presença de macrófagos e linfócitos (Pellegrin e Leite, 2003; Corbeil *et al.*, 2005). O *T. foetus* pode produzir proteinases que clivam IgG1, IgG2 e C3 do complemento. A clivagem destas proteínas pode explicar o fenômeno observado em vacas portadoras, uma vez que o animal não tem dificuldades de responder à presença do protozoário durante o curso da infecção (Kania *et al.*, 2001).

6 - FATORES DE RISCO

A CGB e a TGB ainda são doenças de difícil controle em países com grandes rebanhos bovinos, como o Brasil, onde o sistema de manejo dominante utiliza a monta natural. Por serem doenças sexualmente transmissíveis, com sinais clínicos pouco evidentes, quando a presença das doenças é constatada no rebanho, as perdas econômicas já são grandes. A entrada da CGB e da TGB em um rebanho ocorre quase sempre pela introdução de animais infectados, geralmente touros. A infecção se difunde rapidamente, permanecendo inaparente no início, geralmente pela falta de controle zootécnico dos rebanhos (Lage, 2001).

No Brasil, somente são inseminadas artificialmente em torno de 6% das vacas em idade reprodutiva (Barbosa e Machado, 2008), predominando a monta natural, que é empregada na maior parte dos sistemas de produção extensivos, apresentando todos

os fatores de risco na manutenção da CGB e da TGB em um rebanho (Lage, 2001; BonDurant, 2005). Outro problema encontrado é a presença de touros mais velhos, que tendem a exercer uma dominância sobre os mais jovens por ocasião da monta, o que faz aumentar os riscos de transmissão da doença (Clark, 1971; Barling *et al.*, 1997; Rae e Crews, 2006). Outro ponto importante na epidemiologia dessas doenças é a utilização de touros de repasse, que podem estar infectados e manter a infecção em rebanhos que utilizam a inseminação artificial (Stynen *et al.*, 2003).

7 - FATORES DE VIRULÊNCIA

O processo de infecção é um fenômeno multifatorial que depende da interação de características do microrganismo e do hospedeiro. Um dos primeiros passos para o estabelecimento de uma infecção é a ligação do microrganismo à célula do hospedeiro. Após a ligação inicia-se a sinalização celular, que irá desencadear o processo de resposta imune do hospedeiro. Fatores como motilidade do microrganismo, quimiotaxia, adesão, produção de toxinas e proteases estão envolvidas na patogenia do *C. fetus* subsp. *venerealis* e do *T. foetus* e podem colaborar para a evasão do sistema imune por estes microrganismos (Johnson e Lior, 1988; Kania *et al.*, 2001).

Dentre os vários fatores de virulência de *C. fetus* subsp. *venerealis*, a secreção de citotoxinas já foram descritas, sendo uma das mais importantes e estudada a *Cytolethal Distending Toxin* (CDT) que é codificada por três genes adjacentes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, que podem causar distensão celular seguida de morte celular (Johnson e Lior, 1988).

T. foetus pode secretar proteases, como a cisteína, que são capazes de clivar IgG1, IgG2, C3 do complemento de bovinos, mas que não são capazes de clivar IgA que também é produzida em resposta à infecção por este microrganismo, além de clivar outras proteínas importantes para a defesa do hospedeiro contra o microrganismo

(Talbot *et al.*, 1990; Kania *et al.*, 2001). Com isso, o *T. foetus* consegue evadir do sistema imune colonizando a mucosa do hospedeiro, permanecendo mais tempo no organismo. A cisteína também foi capaz de induzir apoptose de células epiteliais vaginais bovinas *in vitro*, por mecanismos ainda não conhecidos (Singh *et al.*, 2004).

O LPS é um componente essencial e característico de membrana externa de bactéria Gram-negativa e é a base para divisão das duas subespécies de *C. fetus* e possui dois sorotipos designados A e B, sendo o *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo A e B, enquanto *C. fetus* subsp. *venerealis* o sorotipo A (Tompson e Blaser, 2000). O LPS do *C. fetus* subsp. *venerealis* é similar ao do *C. jejuni*, um patógeno gastrointestinal que possui LPS com baixo nível de atividade endotóxica, muito menor que a das Enterobacteriaceae (Moran *et al.*, 1994).

McCoy *et al.* (1975) foram os primeiros a descrever a presença de uma microcápsula denominada camada S, que é formada por arranjos de subunidade de peptídeos conhecidos como proteínas SAP (*Surface Array Proteins*), que são proteínas de alto peso molecular, que representam 10% do total de proteínas celulares e podem ocorrer de múltiplos tamanhos moleculares variando de 97 a 149 kDa. em *C. fetus* subsp. *venerealis* (Pei *et al.*, 1988). A presença da camada S proporciona eficiente colonização no trato genital do hospedeiro, sugerindo sua importância na interação patógeno-hospedeiro (Garcia e Brooks, 1993).

A manutenção da camada S apresenta vantagens para o *C. fetus*. Esse mecanismo, muito eficiente, gera a diversidade antigênica que é empregada pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* para sua persistência no hospedeiro podendo explicar o fenômeno observado em vacas portadoras. Esses animais não estão preparados para responder prontamente a estas alterações nos epítomos do antígeno, no curso da infecção. Além disso, essa variação de proteínas facilita a evasão do *C. fetus* subsp. *venerealis* à fagocitose, aumentando sua persistência no hospedeiro por impedir a ligação da proteína C3b do

complemento (Dworkin e Blaser, 1997). Além disto, a camada S recobre outras estruturas imunogênicas de *C. fetus* subsp. *venerealis*, incluindo o LPS, tornando-o inacessível às defesas do hospedeiro (Garcia *et al.*, 1995).

Rios (2005) testou a capacidade de aderência e invasão de *C. fetus* isolados de trato genital bovino em células HeLa e observou que todas as amostras aderiram, mas nenhuma amostra foi considerada invasiva nos tempos testados. Cottorello (2006) observou um aumento na adesão do *C. fetus* subsp. *venerealis* repassado uma vez em novilhas virgens em células epiteliais HeLa, quando comparado com o *C. fetus* subsp. *venerealis* parental. Essa passagem da bactéria em espécie alvo contribuiu significativamente para o aumento da virulência e o aparecimento de diferenças no perfil unidimensional de proteínas pelo SDS – PAGE. Entretanto, as proteínas diferencialmente expressas não foram identificadas.

Stylen (2009) observou em uma análise proteômica da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* parental e repassada em novilhas por três vezes sequencial, um aumento na expressão de algumas proteínas tais como: *Purine Binding Chemotaxis* (CheW) e *Methyl accepting chemotaxis* (relacionadas a quimiotaxia), *Flagellar Hook associated* (relacionada a motilidade), *Possible Lipoprotein* (relacionada a adesão celular). Essa diferença de expressões das proteínas entre a amostra parental e a amostra repassada em novilhas virgens, sugeriu a interação dessas proteínas com a patogenia da CGB, devido a um aumento da adesão da *C. fetus* subsp. *venerealis* repassada em novilhas virgens em relação a *C. fetus* subsp. *venerealis* parental observada em infecção in vitro em células HeLa.

Bactérias espiraladas, não só do gênero *Campylobacter*, mas também dos gêneros *Helicobacter* e *Arcobacter* são extremamente adaptadas a sobreviver em superfícies mucosas do trato genital no hospedeiro, sendo sua motilidade muito importante neste contexto. O flagelo é de

grande importância para *C. fetus* subsp. *venerealis* estando envolvido na motilidade, quimiotaxia, secreção de proteínas e a evasão da resposta imune inata (Guerry, 2007). Já o flagelo de *T. foetus* não é muito estudado, mas tem sua importância na sua grande motilidade ajudando a vencer o muco presente no trato genital.

O *T. foetus* contém uma variedade de glicolípideos e glicoproteínas na sua superfície. Estes glicoconjugados são abundantes na superfície ou internamente em diferentes compartimentos celulares de muitos protozoários, sendo de grande importância no ciclo de vida desses patógenos, desempenhando papéis importantes na evasão do sistema imune. Processos biológicos tais como interação intercelular, transporte intracelular e reconhecimento celular envolvem a participação de glicoproteínas (Benchimol e Bernardino, 2002). Benchimol *et al.* (1981) demonstraram que a quantidade de glicocálix e do ácido siálico na membrana externa do *T. foetus* varia de acordo com o desenvolvimento da TGB.

Singh (1993) isolou e caracterizou um lipofosfoglicano (LPG) de *T. foetus*, com aproximadamente 50-70 kDa. Essa molécula é o maior glicoconjugado presente na superfície do *T. foetus*. Singh *et al.* (2001) observaram que o LPG de *T. foetus* pode ser secretado para o meio durante a infecção, sendo chamado de antígeno solúvel glicosilado (SGA). Burgess e McDonald (1992) identificaram na superfície de *T. foetus* glicoconjugados de aproximadamente 190 kDa, denominados antígeno Tf 190 e TF 1.17, relacionadas com a adesão do parasita na célula. O *T. foetus* ainda possui quitina que também é um glicoconjugado de superfície, relacionado com a citoadesão e citopatogenicidade (Gilbert *et al.*, 2000).

8 - RESPOSTA IMUNE INATA

A inflamação causada por um microrganismo após sua ligação com a célula hospedeira envolve a liberação de fatores quimiotáticos que atuam em

conjunto sobre as células inflamatórias para produzir o efeito desejado em cada momento da infecção. Estes fatores quimiotáticos, denominados quimiocinas, são produzidos por grande variedade de células, dentre as quais estão às células epiteliais (Kunkel *et al.*, 1997). Reações inflamatórias agudas causadas por bactéria e ou protozoário normalmente induzem uma resposta celular com predominância de neutrófilos, enquanto reações crônicas caracterizam-se pela presença de linfócitos e macrófagos. Esta predominância de determinados tipos celulares em momentos diferentes da infecção se deve a especificidade de cada membro da família das quimiocinas em atrair subpopulações distintas de células do sistema imune (Kunkel *et al.*, 1997).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores, pois reconhece moldes moleculares associados à patógenos (PAMP) que são expressos nos agentes infecciosos, mas não no hospedeiro, representando estruturas conservadas que são essenciais para a sobrevivência do microrganismo. Os PAMP geralmente não podem sofrer modificações, mesmo que sutis, pois estas podem afetar negativamente o crescimento e a patogenicidade do microrganismo (Smith *et al.*, 2003). Funcionalmente os receptores semelhantes ao *Toll* (*Toll-like receptor* - TLR) podem estar envolvidos com ativação da via de complemento e via de sinalização que resulta na indução de transcrição de uma variedade de genes de resposta imune tais como peptídeos antimicrobianos e citocinas inflamatórias.

Alguns ligantes bacterianos já foram identificados e relacionados com os seguintes TLR: o homólogo *Toll* humano designado TLR4 juntamente com a molécula acessória MD-2 e o cofator CD14, estão envolvidos com a expressão de citocinas inflamatórias em resposta a LPS (Medzhitov *et al.*, 1997) e de TLR4 e MD-2 com a expressão de citocinas inflamatórias em resposta a LPG de protozoários (Alves, 2010 – capítulo 3). Na ausência da molécula acessória MD-2 o receptor TLR4 se torna

afuncional, não conseguindo ser ativado para a expressão de citocinas (Alves, 2010 – Capítulo 3). Interessantemente, o TLR2 é estimulado por diversos PAMP, podendo reconhecer peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, e o TLR5 reconhecendo flagelina presente em bactérias (Werling *et al.*, 2006).

Ao interagirem com os PAMP, os TLR iniciam a cascata sinalizante com a participação de várias proteínas intracelulares tais como MyD88, IRAK-1, IRAK-6, TRAF6 que ativam diretamente NF- κ B assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias (Muroi e Tanamoto, 2008). As quimiocinas são citocinas quimiotáticas, estruturalmente homólogas que direcionam a movimentação das células pelo organismo, do sangue para os tecidos, dando início à resposta inflamatória, controlando o tipo de infiltrado inflamatório. O estudo da expressão de algumas quimiocinas por célula após a infecção fornece informações importantes sobre os mecanismos iniciais da resposta imune contra o patógeno. (Roitt *et al.*, 2005).

As quimiocinas constituem um grupo de 30 pequenas proteínas produzidas por uma ampla variedade de células em resposta a estímulos externos (microrganismos invasores, lesões, etc). Elas são classificadas em dois grupos principais baseados na localização de resíduos de cisteína em sua cadeia de aminoácidos. Quimiocinas do grupo CXC incluem as: CXCL8 (IL-8), CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL3 (GRO γ), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (NAP-2) dentre outras. O grupo CC inclui: CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL3 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES).

A produção de CXCL8 por células epiteliais foi inicialmente relacionada à invasão bacteriana (Jung *et al.*, 1995), sendo considerado um dos primeiros sinais para desencadear a resposta inflamatória aguda após o contato da bactéria com a superfície da mucosa (Mcgee, 1999). Hoje sabemos que a produção de CXCL8 pode ser estimulada também por bactérias que apenas

aderem às células epiteliais (Cotorello, 2006; Stynen, 2009; Alves, 2010 - Capítulo 2 e 3).

Poucos estudos sobre a interação parasita - hospedeiro foram realizados com o *C. fetus* subsp. *fetus* e com o *T. foetus*. Cottorello (2006) comparou a aderência e a expressão de mRNA para CXCL8 em células HeLa infectadas com amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* de referência NCTC 10354^T parental e a mesma amostra ativada em novilha virgem por inoculação intravaginal. A amostra repassada em novilha apresentou uma maior aderência nas células epiteliais e estimulou o acúmulo precoce e mais intenso de mRNA para CXCL8 e uma expressão de CCL3 mais tardia a partir de 8 h pós infecção em células HeLa do que a amostra parental. Os resultados obtidos indicam o provável envolvimento dessas quimiocinas na resposta imune inicial das células epiteliais do hospedeiro em resposta a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Stynen (2009) observou que a inoculação seriada de uma amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, em novilhas virgens induziu aumento gradativo no índice de aderência e na produção de mRNA para CXCL8 em células HeLa pelas amostras isoladas após a segunda e a terceira passagem na espécie alvo. Isto demonstra adaptação gradual da amostra repicada por anos *in vitro* ao ambiente do trato genital, o que resultou na expressão diferenciada de proteínas entre a amostra parental utilizada em laboratório e a amostra isolada após a segunda e terceira passagem em novilhas virgens.

Alves (2010 - Capítulo 2) observou que a expressão de mRNA para CXCL8 em células epiteliais infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* ocorre via *Toll-like receptor*. A bactéria utilizada neste estudo foi repassada em novilha virgem por três vezes sequenciais (Stynen, 2009). Após o tempo de 2 horas foi observada uma expressão de mRNA para CXCL8, atingindo um pico às 6 h e se mantendo até às 12 horas pós infecção. Essa expressão foi via TLR2 e provavelmente induzido por uma lipoproteína de membrana que constitui a

maior parte da membrana externa do *C. fetus* subsp. *venerealis*.

O *T. foetus* foi capaz de induzir a expressão de mRNA para CXCL8 em células epiteliais após 18 h de infecção sendo pontual. Essa expressão de mRNA para CXCL8 ocorre via *Toll-like receptor*. E com a utilização de células transfectadas ficou claro a participação de TLR4/MD2 nesta expressão. A presença de LPG na superfície do parasito pode estar induzindo a expressão de mRNA para CXCL8 (Alves, 2010 - Capítulo - 3).

9 - IMUNIDADE ADAPTATIVA

A cinética da imunidade humoral contra o *C. fetus* na mucosa vaginal foi investigada por diversos pesquisadores (Corbeil *et al.*, 1974a; Corbeil *et al.*, 1974b; Van Aert *et al.*, 1977). A classe de imunoglobulinas que aparece inicialmente em novilhas infectadas experimentalmente é a IgM, seguida da IgA, e por último da IgG1. Em novilhas infectadas por via vaginal o aparecimento das classes IgM e IgA é quase simultâneo, precedendo a IgG1, que ocorre aproximadamente na 8ª semana após a infecção. Isto indica a importância da imunidade conferida pela IgA para a resistência à infecção natural pelo *C. fetus*, uma vez que, em fêmeas imunizadas por via sistêmica as classes de imunoglobulinas que ocorrem são a IgM, IgG1 e IgG2, não sendo detectada a IgA, nem no soro, nem nas secreções vaginais (Corbeil *et al.*, 1974b).

A IgG é a primeira classe ativa de anticorpos no útero, após a infecção natural, enquanto a IgA predomina na vagina. A IgG imobiliza e opsoniza o *C. fetus* permitindo a morte intracelular pelos macrófagos e neutrófilos no endométrio (Corbeil *et al.*, 1980). A IgA aparece logo em seguida a IgM na vagina, entre três a cinco semanas após a infecção. É a imunoglobulina que apresenta um título maior e por mais tempo, podendo persistir por mais de 40 semanas. É a principal imunoglobulina responsável por impedir o início da infecção, prevenindo a bactéria de ascender ao útero, apesar de não ser opsonizante. Dessa forma, a

colonização da vagina pode persistir por um período que varia de 6 a 24 meses. Este constante estímulo ao sistema imune local promove níveis elevados e protetores de anticorpos, o que permite o retorno da fertilidade do animal, após três a seis meses do início do processo, ou seja, em torno de três cios após a infecção (Corbeil *et al.*, 1980).

A literatura descreve a existência de fêmeas persistentemente infectadas pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*, demonstrando que novilhas inoculadas experimentalmente podem albergar o agente por períodos que variam de 6 a 24 meses (Cipolla *et al.*, 1994). As proteínas SAP podem explicar o fenômeno observado nessas vacas portadoras, uma vez que o animal não consegue responder prontamente a estas alterações nos epítomos do antígeno que variam no curso da infecção, caracterizando-se como um mecanismo de defesa do agente contra resposta imune do hospedeiro (Garcia e Brooks, 1993).

A imunidade na fêmea em relação o *T. foetus*, está baseada na produção inicial de IgM muito rápida, seguida de IgA e IgG1 a partir da 5ª semana pós infecção, na mucosa vaginal, período em que geralmente ocorre reabsorção embrionária. Por volta da 8ª e 11ª semana há um aumento da taxa de IgA e IgG1. Já na 24ª e 25ª semana ocorre um novo aumento nos níveis de IgA no muco vaginal (Gault, 1995). Nas fêmeas portadoras aparentemente há uma falha na imunidade ao nível de mucosa vaginal e esta falha parece ser importante para a manutenção da infecção nos rebanhos (Pellegrin e Leite, 2003). Essa falha provavelmente esta ligada a produção de proteinase cisteína que são capazes de clivar IgG1, IgG2, C3 do complemento de bovinos, mas que não são capazes de clivar IgA e outras proteínas importantes para a defesa do hospedeiro contra o microrganismo. Onde a IgA é preservada e esta é apenas aglutinante enquanto a IgG1 que é uma imunoglobulina opsonozante e aglutinante é clivada (Talbot *et al.*, 1990).

10 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O correto diagnóstico é o primeiro passo para a implantação de medidas de controle eficazes contra a CGB e a TGB. A observação das manifestações clínicas, do histórico dos animais e da avaliação dos dados zootécnicos da propriedade podem auxiliar no diagnóstico da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e por *T. foetus*. A principal manifestação clínica de ambas as doenças é a repetição cio em intervalos aumentados e irregulares (Stoessel, 1982; BonDurante, 2005). O intervalo de retorno ao cio pode variar, mas geralmente é superior a 35 dias (Clark, 1971; Skirrow e BonDurant, 1988). Isto é decorrente da mortalidade embrionária que ocorre após a implantação do embrião, o que leva a um maior período entre um cio e outro (Alves, 2010).

Na TGB, as fêmeas podem apresentar corrimento vaginal purulento ao retornarem ao cio, em função de piometra causada pelo *T. foetus* (Parsonson *et al.*, 1976). Característica importante dessa piometra, que pode ser encontrada em torno de 5% das vacas, é sua ocorrência no pós-coito, o que sugere infecção por *T. foetus* (BonDurant, 2005). Outra característica clínica que pode ajudar a diferenciar a TGB da CGB é que pode haver presença de maceração fetal na infecção por *T. foetus* enquanto a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* pode produzir fetos mumificados (Stoessel, 1982). No entanto, as lesões mais frequentemente encontradas no feto abortado são, na CGB, a brocopneumonia supurativa e hepatite intersticial, mas não são patognomônicas da doença (Bryner, 1990).

A maioria das fêmeas consegue eliminar a infecção após três a seis ciclos e podem então ficar gestantes (BonDurant, 2005). Entretanto, várias vacas mantêm a infecção mesmo durante a gestação, o que pode ocasionar abortos e fêmeas com infecção vaginal após o parto (Cipolla *et al.*, 1994; Corbeil *et al.*, 1998). Abortos podem ocorrer em ambas as infecções, entre 5% a 10%, sendo mais frequentes no terço médio da gestação – em torno do 4º e 5º mês de

gestação – mas também podendo ocorrer em períodos mais tardios (Clark, 1971; Rhyan *et al.*, 1988, BonDurant, 1990; Bryner, 1990). A retenção de placenta também é ocorrência comum na CGB e TGB (Clark, 1971; Stoessel, 1982).

Vários parâmetros zootécnicos, além das altas taxas de retorno ao cio, estão alterados em rebanhos que possuem animais infectados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* ou pelo *T. foetus*. A idade à primeira cria é tardia em decorrência das novilhas serem mais susceptíveis à infecção por estes agentes, o que ocasiona maiores perdas nesta categoria animal (Stoessel, 1982). Também, como consequência das repetições de cio, há um aumento do intervalo entre partos, pois são necessárias várias coberturas antes que as fêmeas adquiram imunidade e fiquem gestantes (BonDurant, 2005). Ao final da estação, grande número de fêmeas, principalmente as novilhas, estão vazias, acarretando aumento do período da estação de monta, com conseqüente aumento da estação de parição (Pellegrin *et al.*, 2002). A taxa de natalidade também é baixa nos rebanhos com estas doenças, em decorrência de que várias fêmeas não conseguem debelar a infecção e ficam gestantes e dos abortos que podem ocorrer (Goodger e Skirrow, 1986).

Apesar de todas as indicações de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* proveniente dos sinais clínicos e histórico dos animais e da propriedade, o diagnóstico laboratorial é fundamental, pois só ele pode confirmar qual o agente causador do problema observado no rebanho. O material para o diagnóstico laboratorial da CGB e da TGB deve ser coletado preferencialmente dos touros, por estes estarem em menor número na propriedade, além de serem os grandes disseminadores da doença nos rebanhos (BonDurant, 2005). Entretanto, o diagnóstico laboratorial também pode ser realizado em material coletado de fêmeas, de fetos abortados e de membranas fetais (Stoessel, 1982; BonDurant, 2005).

Nos machos pode ser coletado esmegma por raspador, pipeta de inseminação

artificial ou lavado prepucial (Genovez *et al.*, 1986; Fernandes e Gomes, 1992). O raspado é feito pela escarificação da mucosa do prepúcio e do pênis do touro utilizando um raspador ou uma pipeta de inseminação presa a uma seringa ou pêra para puxar o esmegma coletado. O material coletado é então inoculado em meios de transporte específicos para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* (Lander, 1990; Lage *et al.*, 1992; Appel *et al.*, 1993). O lavado prepucial é realizado introduzindo-se em torno de 50 mL de solução salina tamponada no prepúcio, massageando-se o prepúcio com o óstio fechado por uma das mãos e recoletando-se o material por um sistema de sifão. Nas fêmeas, pode ser coletado muco cervico-vaginal com pipeta de inseminação ou tampão absorvente (Fernandes e Gomes, 1992; Styner *et al.*, 2003). Um aspecto importante a ser levado em conta é que os touros devem ser mantidos em repouso sexual por 7 a 15 dias antes da coleta do material e que três coletas, com os mesmos intervalos, permanecendo o animal em descanso sexual, devem ser realizadas para se aumentar a sensibilidade do diagnóstico (Stoessel, 1982; Skirrow e BonDurant, 1988).

Parte do material coletado poderá ser utilizada para detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* e outra para a detecção de *T. foetus*. Para a detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* o material deverá ser transportado em meios de transporte e enriquecimento (TEM) que propiciam ambiente de microaerofilia adequado à sobrevivência do microorganismo e utilizam misturas de antibióticos para reduzir a flora bacteriana presente no prepúcio (Lander, 1990, Lage *et al.*, 1992). O material em TEM deve ser transportado a 4°C e colocado em estufa a 37°C para crescimento por até três dias. Neste período repiques são realizados em ágar infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*), acrescido de 10% de sangue desfibrinado de equino, em condições de microaerofilia (5% O₂, 5% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂) a 37°C por 48 horas. As colônias pequenas e translúcidas são escolhidas para a realização da coloração de Gram e observação microscópica da

morfologia espiralada característica das bactérias do gênero *Campylobacter*. Para se confirmar a identificação, testes bioquímicos são realizados, sendo os principais para se diferenciar *C. fetus* subsp. *venerealis* de *C. fetus* subsp. *fetus* a produção de H₂S em meio contendo cistina e a tolerância a 1% de glicina, testes nos quais as subespécies são negativas e positivas para ambos, respectivamente (Vandamme, 2000). Além disto, a imunofluorescência direta (IFD) (Figueiredo *et al.*, 2002) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) também podem ser utilizadas (Hum *et al.*, 1997, McMillen *et al.*, 2006).

Por ser um microrganismo fastidioso, de difícil isolamento e identificação, outras técnicas diagnósticas foram desenvolvidas. A IFD é um teste que também pode ser utilizado para o diagnóstico direto da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*. Sua sensibilidade analítica, ou seja, seu limite de detecção, foi estimado em 102 bactérias/mL (Figueiredo *et al.*, 2002). O material coletado por lavado prepucial é submetido a duas centrifugações, sendo a primeira a 600 X g, para a retirada de debris presentes no lavado, e a segunda a 13000 X g, para sedimentação das bactérias presentes. O sedimento é fixado por acetona em lâmina para IFD e é utilizado um soro anti-*C. fetus* marcado com fluoresceína para detecção do agente em microscopia de fluorescência (Figueiredo *et al.*, 2002).

Outros testes estão sendo estudados para aplicação no diagnóstico da CGB como ensaio imunoenzimático (ELISA), desenvolvido para detecção de anticorpos da classe IgA no muco vaginal de fêmeas bovinas com suspeita de infecção pelo *C. fetus*. Esses anticorpos foram escolhidos porque persistem por mais tempo e sua concentração permanece constante no trato genital por muitos meses (Hewson *et al.*, 1985; Hum *et al.*, 1994). Brooks *et al.* (2004) utilizaram anticorpos monoclonais contra LPS de *C. fetus*, em ELISA direto, mas não obtiveram bom limite de detecção (10⁴ a 10⁶ UFC/mL), tornando inviável a utilização da técnica com estes anticorpos monoclonais. Também foram desenvolvidos e são utilizados ensaios de PCR multiplex para

diferenciar o *C. fetus* subsp. *fetus* do *C. fetus* subsp. *venerealis* (Hum *et al.*, 1997) e PCR em tempo real com sondas específicas, também capazes de diferenciar as duas subespécies (McMillen *et al.*, 2006a).

Para a detecção de *T. foetus*, o material coletado tem que ser inoculado e transportado em meio de transporte e enriquecimento de *Diamond* modificado, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e mescla de antibióticos (penicilina e estreptomicina e anfotericina B) (Appel *et al.*, 1993). Esse meio deve ser transportado à temperatura ambiente, protegido da luz e o mais rápido possível ao laboratório, pois o diagnóstico é dependente da viabilidade do microrganismo. Outros meios para transporte e cultivo de *T. foetus* também podem ser utilizados, como o meio de Rieck modificado (Guida *et al.*, 1960), entretanto apresentam menor crescimento do agente. Em alguns países é possível se encontrar o *InPouch TF test* (BioMed Diagnostics, San Jose, CA, EUA), um meio de cultivo comercial para o transporte e crescimento de *T. foetus* em lâmina, desenvolvido nos Estados Unidos da América, que facilita o isolamento e identificação do *T. foetus*. Este sistema comercial é amplamente utilizado em condições de campo, com resultados consistentes e uma sensibilidade de 70 a 97% (Kvasnicka *et al.*, 1996, Rae *et al.*, 1999). Seu manuseio é fácil, porém seu custo é elevado e o mesmo não está disponível no Brasil atualmente.

As técnicas laboratoriais rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da TGB são os métodos diretos de diagnóstico, sendo o principal o isolamento e identificação dos microrganismos. No laboratório os meios de transporte e enriquecimento são incubados a 37°C por 7 a 10 dias, com observação diária do crescimento em microscopia de contraste de fase. A presença de protozoários móveis, de morfologia piriforme e com presença de três flagelos anteriores e um flagelo posterior deve ser confirmado pela coloração de Giemsa. Apesar da morfologia característica, deve-se realizar PCR para a diferenciação de *T. foetus* de outros protozoários que podem

ocasionalmente estar presentes em material de prepúcio (Campero *et al.*, 2003). As técnicas de PCR e PCR em tempo real também são utilizadas com sucesso para o diagnóstico direto da infecção por T. foetus em material clínico (BonDurant *et al.*, 2003; McMillen e Lew, 2006b).

11 – CONTROLE

A principal estratégia de controle da CGB e da TGB é a implantação na propriedade de um programa de inseminação artificial com sêmen de qualidade, visto que isto bloqueará a mais importante via transmissão das doenças, o contato sexual (BonDurant, 2005). Entretanto, a inseminação artificial é difícil de ser empregada em grandes rebanhos de corte onde predomina o sistema de criação extensivo, em função do alto custo do processo e de dificuldades tecnológicas e de recursos humanos das propriedades.

O descarte dos touros portadores de C. fetus subsp. venerealis ou T. foetus, assim como a implantação de estação de monta limitada (60 a 90 dias) e descarte das fêmeas vazias ao final da mesma, e o repouso sexual por 3 a 4 ciclos para recuperação das fêmeas, também é preconizado no controle da CGB e da TGB (Stoessel, 1982; Pellegrin *et al.*, 2002; Rae e Crews, 2006). No entanto, como muitas fêmeas persistem infectadas por vários meses (Clark, 1971; Rhyan *et al.*, 1988; Cipolla *et al.*, 1994; Rae e Crews, 2006), algumas mantendo a infecção por toda a gestação, essa estratégia não propicia a erradicação da CGB e TGB dos rebanhos, apesar de auxiliar em seu controle. Outra medida auxiliar no controle é se evitar a utilização de touros de repasse, pois estes podem constituir reservatórios da infecção (Stynen *et al.*, 2003; BonDurant, 2005).

A segregação de animais jovens para a formação de um rebanho livre dessas doenças sexualmente transmissíveis a partir de novilhas virgens e de touros não infectados seria ideal, mas é difícil de ser realizada na prática, porque é necessário que ocorra segregação total dos animais

livres da infecção daqueles infectados. Na maioria dos sistemas de produção existentes no país, a manutenção desta separação total não é possível ou é economicamente inviável, resultando em infecção do rebanho segregado após alguns meses da implantação da estratégia (Lage, 2001). No entanto, esta é a principal estratégia disponível para o controle da TGB no país.

Uma estratégia que pode se empregada, principalmente em animais doadores de sêmen e embrião, em receptoras ou em animais de maior valor zootécnico, em função dos custos, é o tratamento. Dentre os vários esquemas empregados no tratamento da CGB tem se conseguido bons resultados com o uso de dihidroestreptomicina na dosagem de 22 – 25 mg/kg por via parenteral no primeiro, terceiro e quinto dias de tratamento. No segundo e quarto dias de tratamento deve-se fazer aplicação de uma solução contendo 5g de dihidroestreptomicina diretamente no pênis e prepúcio, realizando uma massagem vigorosa (Seger *et al.*, 1966; Stossel, 1982).

No caso da TGB, o tratamento tem se mostrado mais complicado em função do grande número de princípios ativos e esquemas de tratamento que têm sido preconizados. Alguns dos mais efetivos são o dimetridazole por via oral, o ipronidazole e o metronidazol por via parenteral e a acriflavina de uso tópico (McLoughlin, 1970; Hidalgo *et al.*, 1970; Palladino *et al.*, 1982; Skirrow *et al.*, 1985; Jesus *et al.*, 1996). Em função dos custos, o uso de 50 g de creme neutro contendo acriflavina a 0,5% para o tratamento de cada touro, em aplicação única, parece ser viável (Pellegrin *et al.*, 1998). Entretanto, o tratamento da TGB continua sendo um problema, pois não há disponibilidade de medicamentos veterinários com essas bases para este fim (Guest 1988; SINDAN, 2010).

A avaliação do sucesso do tratamento para ambas as doenças também é realizada pelo encontro de três testes diagnósticos consecutivos, intervalados de 7 a 15 dias de repouso sexual, com resultados negativos

(Skirrow e BonDurant, 1988). A vacinação tem se mostrado bastante eficaz na prevenção das repetições de cio e abortos causados pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* (Leite *et al.*, 1980; BonDurant *et al.*, 1993; Villarroel *et al.*, 2004; BonDurant, 2005). A vacinação é uma forma eficiente de controlar a CGB e a TGB, principalmente em áreas onde a monta natural é muito utilizada. No entanto, há diferenças de eficácia entre as vacinas contra CGB e TGB.

Em rebanhos com infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*, fêmeas em idade reprodutivas devem ser vacinadas anualmente, em torno de 30 dias antes do início da entrada em reprodução (Dekeyser 1984, Stoessel 1982, BonDurant 2005). No caso de primovacinação, as novilhas e vacas devem receber duas doses, uma em torno de 60 e outra em torno de 30 dias antes do início da cobertura. O controle da CGB pelo emprego da vacinação em vacas é muito eficaz, mesmo em rebanhos que apresentam altas taxas de infecção (Clark *et al.*, 1974, Leite *et al.*, 1980; Eaglesome *et al.*, 1986; Ramos *et al.*, 1986). A relação custo-benefício do controle da CGB empregando-se a vacinação das vacas é muito promissora, pois foi demonstrado que o retorno está próximo de 18 vezes os valores investidos na vacinação (Leite, 1977).

Os resultados de utilização de vacinas contra a CGB em touros são controversos na literatura (Bouters *et al.*, 1973; Van Aert *et al.*, 1976; Vasquez *et al.*, 1983; Fóscolo *et al.*, 2005). Todavia, a vacinação de touros deve ser empregada, pois duas doses de vacina aplicadas nos touros em intervalos de 23 dias eliminaram a infecção do *C. fetus* subsp. *venerealis* de mais de 55% dos touros (Fóscolo *et al.*, 2005). Assim, a vacinação de touros deve ser utilizada em conjunto com a vacinação das vacas, por aumentar a imunidade de rebanho, mas não deve ser preconizada como medida única do programa de controle.

Em contraste com os resultados de proteção próxima a 100% na vacinação contra CGB, a proteção conferida pelas vacinas com *T.*

foetus se apresenta em níveis muito mais baixos, 45% de eficácia (Kvasncka *et al.*, 1992). No entanto, sua utilização é preconizada, pois reduz os prejuízos dos proprietários, pela diminuição do tempo de infecção e pelo aumento da taxa de parição (Kvasncka *et al.*, 1992; Sanderson e Gnad, 2002; BonDurant, 2005). BonDurant *et al.* (1993) testaram a imunização sistêmica em novilhas com um antígeno de superfície de *T. foetus*, o LPG TF1.17, eliminando o microrganismo em sete semanas. Este antígeno tornou-se um bom candidato para uma vacina no combate da TGB.

Uma área de estudo na produção de vacinas contra patógenos do trato reprodutivo é a vacinação na mucosa genital. Como ambos os agentes infectam o trato genital, a resposta de anticorpos é predominantemente da classe IgA. As mucosas estão em contato constante com o meio externo, possuem IgA com componente secretório (S-IgA) no epitélio e lâmina própria e contém folículos linfóides organizados na região subepitelial (Ogra, 1996). Cobo *et al.* (2004) testaram uma vacina contendo os dois microrganismos, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus*, utilizando imunizações via sistêmica e via vaginal. Os resultados mostraram melhor desempenho da vacina quando comparado às vacinas utilizadas no mercado, que normalmente utilizam a via subcutânea de aplicação. A aplicação intravaginal da vacina é uma forma de incitar a produção de IgA no local onde ocorre a infecção, sendo IgA um anticorpo que perdura mais e é mais resistente que a IgG em infecções por patógenos do trato genital bovino (Corbeil, 1999).

A proteção estimulada pela vacinação contra TGB é menor em touros, mas recentemente foi observado que a vacinação de touros induz imunidade sistêmica e local, o que leva à resistência ao desafio por *T. foetus* (Clark *et al.*, 1983; Clark *et al.*, 1984; Cobo *et al.*, 2009). Desta forma a vacinação de touros também pode ser indicada junto à vacinação das novilhas e vacas. Para se avaliar as vantagens da utilização de vacinas contra TGB, Villarroel *et al.* (2004) utilizaram um modelo

matemático que considerou os principais fatores de risco para a infecção por *T. foetus*. As análises desse modelo verificaram que a vacinação de fêmeas contra TGB pode ser vantajosa quando não é possível o emprego de medidas que mitiguem os fatores de risco. Entretanto, quando a implantação de medidas que reduzam os fatores de risco for possível, estas se mostraram mais viáveis que a vacinação. Em função das dificuldades de implementação de outras medidas de controle nas condições brasileiras, a utilização da vacinação poderia contribuir para o controle da TGB. No entanto, o mercado brasileiro ainda não conta com essas vacinas (SINDAN, 2010).

A CGB e a TGB são doenças de alta prevalência nos rebanhos bovinos no Brasil e causam elevados prejuízos às cadeias produtivas do leite e da carne no país. Em função disso, devem ser estimuladas medidas que visem o correto diagnóstico dessas enfermidades para que se possa melhorar a aquisição de animais destinados à reprodução e estabelecer medidas de controle adequadas, que permitam a diminuição dos prejuízos e a erradicação dessas duas doenças sexualmente transmissíveis de bovinos. O estudo da interação parasita-hospedeiro CGB e na TGB é de fundamental importância para o conhecimento da patogenia da doença. Além disso, propicia informações para o possível desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento da enfermidade, de vacinas para melhorar os programas de controle e de testes diagnósticos. Na CGB e TGB a resposta humoral está bem definida. Ainda é necessária a compressão da resposta imune inata dessas patogenias que propiciará um avanço no conhecimento da imunidade de mucosas no trato genital, contribuindo para o conhecimento da patogenia de outras doenças nas quais a imunidade de mucosas seja importante.

12 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, T.M. Participação dos receptores semelhantes ao *Toll* na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção *in vitro* de células epiteliais por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus*. 2010. 63f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da UFMG de Belo Horizonte.

AMARAL, V.; SANTOS, S.M.; FENERICH, F.L. Levantamentos de incidência do *Tritrichomonas foetus* no estado de São Paulo. *Biológico*, v. 36, p. 201-204, 1970.

APPEL, L.; MICKELSEN, W.D.; THOMAS, M.H.; *et al.* A comparison of techniques used for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infections in beef bulls. *Agri-practice*, v. 14, n. 2, p. 30-34, 1993.

BACALHAU, A.S. Ocorrência da tricomonose em bovinos da bacia leiteira de Campinas Grande no estado da Paraíba. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 5, p. 21-24, 1981.

BARBOSA R.T., MACHADO R. Panorama da inseminação artificial em bovinos São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste (Documentos n. 84) 28p., 2008.

BARLING, K.; WIKSE, S.; MAGEE, D.; THOMPSON, J.; FIELD, R. Management of beef bulls for high fertility. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 19, p. 888-893, 1997.

BENCHIMOL, M.; BERNARDINO, M.V. Ultrastructural localization of glycoconjugates in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.*, v. 88, p. 134-143, 2002.

BENCHIMOL, M.; PEREIRA, M.E.A; ELIAS, C.A. *et al.* Cell surface carbohydrates in *Tritrichomonas foetus*. *J. Protozool.*, v. 28, n. 3, p. 337-341, 1981.

- BONDURANT R.H. 1990 Abortion/infertility caused by *Tritrichomonas foetus*. p.161-164. In: Kirkbride, C.A. Ed. Laboratory diagnosis of livestock abortion in food animals, Ames, Iowa State University Press.
- BONDURANT R H; CORBEIL R R; CORBEIL L B. Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infect. Immun.*, n. 61, v. 4, p. 1385-94. 1993.
- BONDURANT, R.H.; CAMPERO, C.M.; ANDERSON, M.L.; VAN HOOSEAR, K.A. Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in cultured isolates, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 15, p. 579-584, 2003.
- BONDURANT, R.H.. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 21, p. 383-408, 2005.
- BOUTERS, R.; DEKEYSER, J.; VANDEPLASSCHE, M.; VAN AERT, A.; BRONE, E., BONTE, P. *Vibrio fetus* infection in bulls: curative and preventive vaccination. *Br. Vet. J.*, v. 129, p. 52-57, 1973.
- BRYNER, J.H. 1990. Bovine abortion caused by *Campylobacter fetus*. p. 70-81. In: Kirkbride C.A. Ed. Laboratory diagnosis of livestock abortion in food animals. Ames: Iowa State University Press.
- BROOKS, B.W.; DEVENISH, J.; LUTZEWALLACE, C.L. *et al.* Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.*, v. 103, n. 1-2, p. 77-84, 2004.
- BURGESS, D.E.; MCDONALD, C.M. Analysis of adhesion and cytotoxicity of *Tritrichomonas foetus* to mammalian cells by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 4253-4259, 1992.
- CAMPERO, C.M.; DUBRA, C.R.; BOLONDI, A. *et al.* Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. *Vet. Parasitol.*, n. 112, p. 167-175, 2003.
- CIPOLLA, A.L.; CASARO, A.P.; TERZOLO, H.R. *et al.* Persistence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in experimentally infected heifers. *Vet. Record.*, v. 134, p. 628, 1994.
- CLARK, B.L. Review of bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.*, v. 47, p. 103-107, 1971.
- CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M.; WHITE, B.L. Control of trichomoniasis in a large herd of beef cattle. *Aus. Vet. J.* v. 50, p. 424-426, 1974.
- CLARK, B.L., DUFTY, J.H., PARSONSON, I.M. Immunisation of bulls against trichomoniasis. *Aust. Vet. J.*, v. 60, p. 178-179, 1983.
- CLARK, B.L.; EMERY, D.L.; DUFTY, J.H. Therapeutic immunisation of bulls with the membranes and glycoproteins of *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. *Aust. Vet. J.*, v. 61, p. 65-66, 1984
- COBO, E.R.; MORSELLA, C.; CANO, D. *et al.* Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenol.*, v. 62, p. 1367-1382, 2004.
- COBO, E.R.; CORBEIL, L.B.; GERSHWIN, L.J.; BONDURANT, R.H. Preputial cellular and antibody responses of bulls vaccinated and/or challenged with *Tritrichomonas foetus*. *Vaccine*, v. 28, p. 361-370, 2009.
- CORBEIL, L.B.; DUNCAN, J.R.; SCHURING, G.G.D. *et al.* Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 1084-1090, 1974a.

- CORBEIL, L.B.; SCHURING, G.G.D.; DUNCAN, J.R. *et al.* Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter (Vibrio) fetus* antibodies in serum and cervico – vaginal mucus. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 422–429, 1974b.
- CORBEIL, L.B.; SCHURING, G.G.D.; BIER, P.J. *et al.* Bovine venereal vibriosis: antigenic variation of the bacterium during infection. *Infect. Immun.*, v. 11, p. 240–244, 1975.
- CORBEIL, L.B.; SCHURIG, G.G.; DUNCAN, J.R. *et al.* Immunity in the female bovine reproductive tract based on response to *Campylobacter fetus*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 137, p. 729-743, 1980.
- CORBEIL, L.B.; ANDERSON, M.L.; CORBEIL, R.R.; EDDOW, J.M.; BONDURANT, R.H. Female reproductive tract immunity in bovine trichomoniasis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 39, p. 189–198, 1998.
- CORBEIL, L.B. Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. *Adv. Vet. Med.*, v. 41, p. 217-239, 1999.
- CORBEIL, L.B.; CAMPERO, C.M.; RHYAN, J.C. *et al.* Uterine Mast Cells and Immunoglobulin-E Antibody Responses During Clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Pathol.*, v. 42, p. 282-290, 2005.
- COTTORELLO, A.C.P. *Relação parasita – hospedeiro na infecção de células epiteliais in vitro por Campylobacter fetus subsp. venerealis*. 2006. 76p Tese (Doutorado em Ciência Animal) Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.
- D'APICE, M. Ocorrência do aborto no Estado de São Paulo devido ao *Vibrio fetus*. *Biológico*, v.22, n.1, p.15-18, 1956.
- DEKEYSER, J. Bovine Genital Campylobacteriosis. 1984. In: BUTZLER, J-P. *Campylobacter infection in man and animals*. Boca Raton: CRC Press. p. 181 – 191.
- DOZSA, L.; OLSON, N.O.; CAMPBELL, A. The uterine biopsy technique for following the histologic changes caused by *vibrio fetus* in the uterine mucosa. *Am. J. Vet. Res.*, p. 878-883, 1960.
- DWORKIN, J.; BLASER, M.J. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Mol. Microbiol.*, v. 26, p. 433–440, 1997.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M.; HAWKINS, C.F.; ALEXANDER, F.C. Vaccination studies for the control of Campylobacteriosis in Jamaican cattle. *Vet. Record*. v. 119, p. 299-301, 1986.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I, *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull.*, v. 62, p. 743–775, 1992.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev. Sci. Tech.*, v. 16, p. 215-225, 1997.
- FERNANDES, J.C.T.; GOMES, M.J.P. 1992. Campilobacteriose Bovina. In: Charles T.P. & Furlong, J. Doenças dos bovinos de leite adultos. Coronel Pacheco: EMBRAPA - CNPGL, 141-150p.
- FIGUEIREDO, J.F.; PELLEGRIN, A.O.; FÓSCOLO, C.B. *et al.* Evaluation of direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital Campylobacteriosis. *Rev. Latino Am. Microbiol.*, v. 44, p. 118-123, 2002.
- FÓSCOLO, C.B.; PELLEGRIN, A.O.; LEITE, R.C. *et al.* Vaccination of bulls against bovine genital campylobacteriosis: a therapeutic approach. *Anim. Reprod.*, v. 2, n. 2, p. 122-127, 2005.

- GARCIA, M.M.; BROOKS, B.W. *Campylobacter*. In: PRESCOTT, J.F.; ZUERMER, R.L.; GYLES, C.L.; THOEN, C.D. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2ed. Local: Iowa States University Press, 1993, p. 262-272.
- GARCIA, M.M.; LUTZE-WALLACE, C.L.; DENES, A.S. *et al.* Protein shift and antigenic variation in the S layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of sap A homologs. *J. Bacteriol.*, v. 177, n. 8, p. 1976-1980, 1995.
- GAULT, R.A.; KVASNICKA, W.G.; HANKS, D. *et al.* Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculated with a vaccine containing *Trichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 56, p. 454-459, 1995.
- GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; PICONE, A.B.B. Avaliação de dois métodos de coleta de muco prepucial no diagnóstico da campilobacteriose genital em touros. *Biológico*, v. 52, p. 7-11, 1986.
- GILBERT, R.O.; ELIA, G.; BEACH, D.H. *et al.* Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured *in vitro*. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 4200-4206, 2000.
- GOMES, M.J.P.; FERNANDES, J.C.T.; SILVA, C.E. Identificação de *Trichomonas foetus* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 19, p. 103-111, 1991.
- GOODGER, W.J.; SKIRROW, S.Z. Epidemiologic and economic analysis of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 189, p. 772-776, 1986.
- GRANGER, B.L.; WARWOOD, S.J.; BENCHIMOL, M. *et al.* Transiente invagination of flagella by *Trichomonas foetus*. *Parasitol Res.*, v. 86, p. 699-709, 2000.
- GUIDA, H.C.; MEDEIROS, P.M.; PIZELLI, G.N. Conservação do *Trichomonas foetus* no meio de Rieck modificado. *Instituto de Zootecnia*, v. 35, p. 1-7, 1960.
- GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.*, v. 15, n. 10, p. 456-461, 2007.
- GUEST, G.B. 1988. Extra label policy update. *FDA Vet.*, v. 3, p. 5-6.
- HEWSON, P.I.; LANDER, K.P.; GILL, K.P.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. *Res. Vet. Sci.*, v. 38, n. 1, p. 41-45, 1985.
- HIDALGO, M.A.; CORDOVA, L.F.; JOCHLE, W. A simplified treatment of trichomoniasis in the bull. *Vet. Rec.*, v. 87, p. 161-1623, 1970.
- HUM, S.; QUINN, C.; KENNEDY, D. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Austr. Vet. J.*, v. 71, p. 140-143, 1994.
- HUM, S.; QUINN, K.; BRUNNER, J. *et al.* Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, v. 75, p. 827-831, 1997.
- JESUS, V.L.T.; GUIDA, H.G.; ANDRADE, V.L.B.; SERRA-FREIRE, M.N.; RAMOS A.A.; PEREIRA, E.B.B. Comparação entre o uso de tripaflavina e dimetridazole no tratamento da tricomonose bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 16, p. 49-51, 1996.
- JESUS, V.L.T.; PEREIRA, M.J.S.; ALVES, P.A.M.; *et al.* Fatores intrínsecos do hospedeiro associados à prevalência de Tricomoniose genital bovina. *Ver. Br. Parasitol. Vet.*, p. 159-163, 2004.
- JOHNSON, W.M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.*, v. 4, p. 115-126, 1988.

- JUNG, H.C.; ECKMANN, L.; YANG, S.K. *et al.* A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.*, v. 95, p. 55-65, 1995.
- KANIA, S.A.; REED, S.L.; THOMFORD, J.W. *et al.* Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 78, p. 83-96, 2001.
- KUNKEL, S.L.; LUKACS, N.W.; CHENSUE, S.W. *et al.* Chemokines and the inflammatory response. p. 121-131. In: REMICK, D. G.; FRIEDLAND, J.S. (Ed). *Cytokines in health and disease*. New York: M. Dekker, 1997.
- KVASNICKA, W.G.; HALL, M.; HANKS, D. Current concepts in the control of bovine trichomoniasis. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 18, p. 105-111, 1996.
- KVASNICKA, W.G.; HANKS, D.; HUANG, J.C.; HALL, M.R.; SANDBLOM D.; CHU H.J.; CHAVEZ L.; ACREE, W.M.. Clinical evaluation of the efficacy of inoculating cattle with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *Am J Vet Res.*, v. 53, n. 11, p. 2023-2027, 1992.
- LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Campilobacteriose Genital Bovina (Vibriose). *Pecuária de Corte*, n. 10, p. 50-54, 2000.
- LAGE, A.P. Epidemiologia e controle da campilobacteriose genital bovina. In: *Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos*, 5. 2001, Local: Brasil-2001. p. 17-25.
- LANDER, K.P. The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br. Vet. J.*, v. 146, n. 4, p. 334-340, 1990.
- LEITE, R.C. *Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina*. 1977. 38p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.
- LEITE, R.C.; REIS, R.; RIVERA, F.E.B. Controle da vibriose bovina através da vacinação. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 32, p. 259-264, 1980.
- LEITE, R.C. Leite, R.C., Pellegrin, A.O., Martins, N.E., Silva, N., Gomes, L.I., Costa, G.M., Reinato, A.P.R., Guimarães, P.H.S. & Lage, A.P. Tricomonose bovina: diagnósticos realizados na Escola de Veterinária da UFMG no período de 1979 a 1995. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n.2, p. 166-168, 1997.
- MCGEE, D.W. Inflammation and mucosal cytokine production. In: OGRA, P. L. *Mucosal Immunology*. 2 Ed. San Diego: Academic Press, 1999. p. 559-573.
- MCCOY, E.C.; DOYLE, D.; BURDA, K.; *et al.* Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. *Infect. Immun.*, v. 11, n. 3, p. 517-525, 1975.
- MCLOUGHLIN, D.K. Dimetridazole, a systemic treatment for bovine venereal trichomoniasis. 1970. III. Trials with cows. *J. Parasitol.*, v. 56, p. 39- 40.
- MCMILLEN, L. FORDYCE, G.; DOOGAN, V.J. *et al.* Comparison of culture and a Novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 938-945, 2006.
- MCMILLEN, L.; LEW, A.E. Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet Parasitol.*, v. 141, p. 204-215, 2006.

- MEDEIROS, P.M.; FIGUEIREDO, J.B. Trichomonose bovina em Minas Gerais. *Arq. Vet. UFMG*, v. 23, p. 143-147, 1971.
- MELLO, M.H. Dados sobre a incidência de tricomonose bovina em alguns estados do Brasil. *Boletim Inseminação Artificial*, v. 6, p. 16-23, 1954.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.J.R. Innat immunity impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 9, p. 4-9, 1997.
- MEGALE, F. Identificação do *Trichomonas foetus* em Minas Gerais (Comunicação científica). *Arq. Esc.Vet. UFMG*, v. 15, p. 405, 1963.
- MIRANDA, K.L. Prevalência da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos de corte no Brasil – 2000. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2005.
- MORAN, A.P.; O'MALLEY, D.T.; KOSUNEME, T.U. *et al.* Biochemical characterization of *Campylobacter fetus* Lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 9, p. 3922-3929, 1994.
- MUROI, M.; TANAMOTO, K. TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. *J. Leukoc. Biol.*, v. 83, p. 702-707, 2008.
- OGRA, P.L. Mucosal immunoprophylaxis: an introduction. p. 3-14. In: KIYONO, H., OGRA, P.L., MACGHEE, J.R. (Ed.). *Mucosal Vaccines*. San Diego: Academic Press. 1996. 479p.
- OIE – World Organization for Animal Health, 2009. Bovine genital campylobacteriosis and Trichomonosis. Disponível em: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=diasease_timelines. Acesso em: 10 dez 2009.
- PALLADINO, M.R., CAMPERO, C.M., VILLAR, J.A. Resistência de *Trichomonas foetus* a tricomonocidas. *Gac. Vet.*, v. 44, p. 400- 406, 1982.
- PARSONSON, I.M.; CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* in infection in virgin heifers. *J. Comp. Pathol.*, v. 86, p. 59–66, 1976.
- PEI, Z.; BURUCOA, C.; GRIGNON, B. *et al.* Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 938–943, 1998.
- PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C. *et al.* Campilobacteriose genital bovina em touros do mato grosso do sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n. 1, p. 43–46, 1998.
- PELLEGRIN, A.O.; LAGE, A.P.; SERENO, J.B. *et al.* Bovine Genital Campilobacteriosis in Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v. 55, n. 3, 2002.
- PELLEGRIN, A.O.; LEITE, R.C. *Atualização sobre tricomonose genital bovina*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 22p (Documentos n. 54).
- RAE, D.O.; CREWS, J.E. *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Clin. Foodm.*, v. 22, p. 595–611, 2006.
- RAE, D.O.; CHENOWETH, P.J.; GENHO, P.C.; MCINTOSH, A.D.; CROSBY, C.E.; MOORE, S.A. Prevalence of *Tritrichomonas fetus* in a bull population and effect on production in a large cow-calf enterprise. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 214, p. 1051–1055, 1999.
- RAMOS, A.; GUIDA, H.G. Aglutininas anti-*Campylobacter fetus* em mucos vaginais de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 2, p. 715, 1978.

- RAMOS, A.A.; LEITE, M.L.A.S.; GUIDA, H.G.; MACHADO, R.D.; ANDRADE, V.L.B.; JESUS, V.L.T.; CAMARGO, A.J.R. Eficiência de uma vacina contra a Campilobacteriose Bovina com culturas autóctones em adjuvante oleoso. *Pesq. Vet. Bras.* v. 6, p. 15-21, 1986.
- RHYAN, J.C.; STACKHOUSAEN, L.L.; QUINN, W.J. Fetal and placental lesions in Bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Pathol.* v. 25, p. 350-355, 1988.
- RIOS, P.A.G.M. Aderência e invasibilidade em células HeLa de amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de animais. 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.
- ROCHA, F.S.; JESUS, V.L.T.; TORRES, H.M. et al. Investigação de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do Médio Paraíba, RJ. *Cienc. Rural*, v.39, n.5, p. 1587-1590, 2009.
- ROEHE, R. Tricomoníase bovina. *Bol. Direct. Prod. Anim.*, v. 3, n. 6, p. 21-26, 1948.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (Eds.) *Imunologia* 6ed. São Paulo: Manole, 2005, 481p.
- SANDERSON, M.W.; GNAD D.P. Biosecurity for reproductive diseases. *Vet. Clin. Food. Anim.* v. 18, p. 79-98, 2002.
- SEGER, C.L.; LANK, R.B.; LEVY, H. Dihydrostreptomycin for treatment of genital vibriosis in the bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 149, p. 1634-1639, 1966.
- SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal. 2010. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em <<http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>>. Acesso em 17 de junho de 2010.
- SINGH, B.N. Lipophosphoglycan-like glycoconjugate of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 10, p. 152-154, 1993.
- SINGH, B.N.; BONDURANT, R.H.; CAMPERO, C.M. et al. Immunological and biochemical analysis of glycosylated surface antigens and lipophosphoglycan of *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.*, v. 87, p. 770-777, 2001.
- SINGH, B.N.; LUCAS, J.J.; HAYES, G.R. et al. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 72. n. 7, p. 4151-4158, 2004.
- SMITH, M.F.JR.; MITCHELL, A.; LI, G. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 35, p. 32552-32560, 2003.
- SKIRROW, S.; BONDURANT, R.; FARLEY, J.; CORREA, J. Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls. *J. Am. Vet. Med. Ass.* v. 187, p. 405- 407, 1985.
- SKIRROW, S.Z.; BONDURANT, R.H. Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, v. 58, n. 8, p. 591-603, 1988.
- STOESSEL, F. Las enfermedades venereas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital. Zaragoza: Acribia, 1982.
- STYNEN, A.P.R.; PELLEGRIN, A.O.; FÓSCOLO, C.B.; FIGUEIREDO, J.F.; CANELLA FILHO, C.; LEITE, R.C.; LAGE A.P. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 55, p. 766-769, 2003.
- STYNEN, A.P.R. *Análise proteômica e de virulência de Campylobacter fetus subsp. venereali após infecção experimental em novilhas*. 2009. 69p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

TALBOT, J.A.; NIELSEN, K.; CORBEIL, L.B. Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. San Diego: University of California, 1990. p. 384-390.

THOMPSON, A. S.; BLASER, M. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. In: Nachamkin, I.; Blaser, M. J. *Campylobacter*. 2 Ed., Washington: ASM PRESS, 2000. p. 321-347.

VAN AERT, A., DEKEYSER, P., FLORENT, A.F., *et al.* Nature of *Campylobacter fetus* agglutinins in vaginal mucus from experimental infected heifers. *Br. Vet. J.*, v. 133, p. 88-94, 1977.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae* In: NACHAMKING, N.; BLASER, M.J. (Eds.) *Campylobacter* 2Ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000, p. 3-20.

VARGAS, A.C.; COSTA, M.M.; VAINSTEIN, M.H.; KREUTZ, L.C.; NEVES, J.P. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Vet. Microbiol.* v. 19, p. 121-132, 2003.

VASQUEZ, L.A.; BALL, L.; BENNETT, B.W.; RUPP, G.P.; ELLIS, R.; OLSON, J.D.; HUFFMAN, M.H. Bovine Genital Campilobacteriosis (vibriosis): Vaccination of experimentally infected bulls. *Am. J. Vet. Res.* v. 44, p. 1553-1557, 1983.

VILLARROEL, A.; CARPENTER, T.E.; BONDURANT, R.H. 2004. Development of a simulation model to evaluate the effect of vaccination against *Tritrichomonas foetus* on reproductive efficiency in beef herds. *Am. J. Vet. Res.* 65:770-775.

WAGNER W.C.; DUNN H.O.; VAN VLECK L.D. 1965. Incidence of *Vibrio fetus* in an A.I. stud. *Cornell Vet.* 55:209-220.

WERLING D.; PIERCY, J.; COFFEY, T.B. Expression of Toll-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination? *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 112, p. 2-11, 2006.

CAPÍTULO 2

***Campylobacter. fetus* subsp. *venerealis* estimula a produção de mRNA para CXCL8 via TLR2**

RESUMO

A campilobacteriose genital bovina é uma doença sexualmente transmissível causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e que provoca perdas econômicas em países com grande rebanhos e que utilizam monta natural como principal forma de reprodução. A resposta imune inata é considerada a primeira linha de defesa contra patógenos invasores e sua ativação é desencadeada pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) pelos receptores semelhantes ao *Toll*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a participação dos *Toll-like receptors* na resposta imunológica inata contra o *C. fetus* subsp. *venerealis* e sua participação na indução da transcrição de mRNA para CXCL8 por diferentes células epiteliais. A amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, previamente ativada por três passagens em novilhas virgens (*C. fetus* subsp. *venerealis* P3), foi usada na infecção das células HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 (concentração de 4×10^5 células/mL) com uma multiplicidade de infecção de 500 bactérias/mL e nos tempos de infecção de 2, 6 e 12 h. A qRT-PCR foi realizada com iniciadores específicos para GAPDH, CXCL8, TLR2, TLR4, MD-2 e TLR5. Foi observado um aumento na transcrição de mRNA para CXCL8 em células HeLa e HEK293-TLR2 a partir de 6 h. Esse resultado sugere que a ativação de transcrição de CXCL8 por *C. fetus* subsp. *venerealis* está relacionada ao TLR2.

Palavras chave: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, CXCL8, HeLa, MDBK, HEK293, *Toll-like receptor*.

ABSTRACT

Bovine genital Campylobacteriosis is a sexually transmitted disease caused by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and causes economic losses in countries with large herds and natural mating as a principal means of reproduction. The innate immune response is considered the first line of defense against evading pathogens and their activation is triggered by recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMP) by Toll-like receptors. This study aimed to evaluate the involvement of Toll-like receptors in innate immune response against *C. fetus* subsp. *venerealis* and to check the expression of CXCL8 mRNA by different epithelial cells. *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T strain, previously activated by three passages in virgin heifers (*C. fetus* subsp. *venerealis* P3), was used. The cells used were: HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 at a concentration of 4×10^5 cells/mL with a multiplicity of infection of 500 bacteria/mL and incubated for 2, 6 and 12 h. The RT-PCR was performed with primers specific for GAPDH, CXCL8, TLR2, TLR4, TLR5 and MD-2. We observed an increase in CXCL8 mRNA transcription in HeLa and HEK293-TLR2 cells after 6 h. This result suggests that the CXCL8 activation of transcription by *C. fetus* subsp. *venerealis* is related with TLR2.

Keywords: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, CXCL8, HeLa, MDBK, HEK293, *Toll-like receptor*.

1 - INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma doença sexualmente transmitida, causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, que provoca perdas econômicas decorrentes de problemas reprodutivos como repetições frequentes de cio com intervalos irregulares e aumentados, infertilidade temporária, morte embrionária, queda no nascimento de bezerras e na produção de leite e além do aumento na reposição de touros (Dekeyser, 1984).

A CGB possui distribuição mundial, tendo sido detectada em todos os continentes. Dados recentes da OIE mostram a sua presença em países como África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Estados Unidos da América, França, Inglaterra e Nova Zelândia, dentre outros (OIE, 2009). No Brasil, 20% dos touros de propriedades de pecuária de corte dos estados com maior população bovina estão infectados por *C. fetus*, o que demonstra que a CGB está disseminada no Brasil. (Miranda, 2005).

C. fetus subsp. *venerealis* é uma bactéria Gram-negativo, espiralada que possui flagelo polar e móvel, não forma esporo e é microaerófila (Vandamme, 2000). O habitat no touro, que é assintomático, é o prepúcio, onde o microrganismo está localizado predominantemente nas criptas epiteliais, podendo também ser encontrado nas glândulas penianas e na uretra distal. Na vaca, coloniza a vagina, cérvix, útero e oviduto caracterizando uma infecção ascendente (Dekeyser, 1984).

Uma importante característica patogênica do *C. fetus* subsp. *venerealis* é possuir uma camada externa ao lipopolissacarídeo da parede celular (LPS) denominada camada S (*Superficial*) que é formada por um arranjo de subunidades protéicas ou SAP (*Surface Array Proteins*) (Pei *et al.*, 1998). Outro fator associado à virulência é a presença de flagelo, importante na colonização das células do hospedeiro e que está envolvido na motilidade, quimiotaxia e na secreção de

proteínas de virulência (Dunn *et al.*, 1987). A produção de citotoxinas, em especial a CDT (*Cytolethal Distending Toxin*), que pode causar a morte celular e estimular a produção de citocinas também está relacionado com a patogenicidade de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Johnson e Lior, 1988).

Após a entrada do patógeno no trato genital, o primeiro passo para o estabelecimento da infecção é a sua adesão às células epiteliais com a consequente colonização do epitélio do trato genital (Stoessel, 1982). *C. fetus* subsp. *venerealis* é capaz de aderir em células epiteliais, mas não é capaz de invadir essas células *in vitro* (Rios, 2005; Cottorello, 2006; Stynen, 2009)

As células epiteliais são provavelmente os locais onde ocorre o início da resposta inflamatória do hospedeiro à infecção com a liberação de citocinas pró-inflamatórias que recrutam células envolvidas na resposta imunológica para o sítio da injúria. Os *Toll-like receptors* (TLR), receptores encontrados na superfície de várias células (macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e outras) são um grupo de proteínas transmembrânicas altamente conservadas que tem papel fundamental no reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP). Os TLR ao interagirem com os PAMP iniciam a cascata sinalizante que ativa diretamente o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e outros membros da MAPK (mitogen-activated protein kinase). A ativação da MAPK resulta no aumento da transcrição dependente da proteína 1 de ativação (AP-1) e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias, iniciando a resposta imunológica adaptativa (Weling e Jungi, 2003). O TLR4 juntamente com moléculas acessórias MD-2 e o co-fator CD14 estão envolvidos com a expressão de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (Medzhitov e Janeway, 1997). O TLR2 está relacionado ao reconhecimento de peptídeo-glicanos e lipoproteínas bacterianas e o TLR5 reconhecendo flagelina presente em bactérias (Werling *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que após a colonização do *C. fetus* subsp. *venerealis* ocorre a produção de mRNA para CXCL8 (IL-8) em células HeLa, indicando o envolvimento desta quimiocina na resposta imunológica inicial das células epiteliais do hospedeiro ao patógeno (Cottorello, 2006; Stynen, 2009). Porém, não se sabe se essa produção ocorre via reconhecimento de *C. fetus* subsp. *venerealis* pelos TLR e quais desses receptores estão envolvidos na indução da expressão dessa quimiocina.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a participação do TLR expressos nas células epiteliais no reconhecimento de *C. fetus* subsp. *venerealis* pela análise do padrão de transcrição de mRNA para CXCL8 por diferentes células epiteliais infectadas com a bactéria.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Amostra bacteriana

A amostra de referência *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T foi inoculada em novilha virgem e, após sete dias de infecção, a amostra foi reisolada a partir do muco cérvico-vaginal do animal infectado, passando então a ser denominada amostra P1. Subsequentemente, a amostra P1 foi inoculada na vagina de outra novilha virgem e após nove dias de infecção, foi reisolada a partir de swab do útero deste animal (amostra P2). A amostra P2 foi inoculada em outra novilha virgem e seu reisolamento foi feito a partir do muco cérvico-vaginal aos 14 dias pós-infecção (P3). Em todos os experimentos foi usada a amostra P3 obtida a partir de três passagens consecutivas em novilhas virgens.

As bactérias foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (Difco - EUA) suplementado com 10% de sangue desfibrinado equino e cultivado a 37°C sob microaerofilia (5% O₂, 5% H₂, 10% CO₂, e 80% N₂) por 48 horas. A amostra foi repicada apenas duas vezes para não perder as características adquiridas. A amostra P3 ficou estocada a -80°C em caldo *Brucella* acrescido com 20% de glicerol (Difco - EUA) até o seu uso.

2.2 - Linhagens celulares

Foram usadas as linhagens de células HeLa (*American Type Culture Collection* – ATCC – CCL2™) provenientes de carcinoma cervical humano e de células MDBK (ATCC - CCL22™) provenientes de rim bovino, adquiridas no Banco de células de Escola de Veterinária da UFMG. As células HEK293 (ATCC - CRL1573™) provenientes de rim de feto humano, HEK293 transfectada com o gene codificante de TLR2 (HEK293-TLR2) e HEK293 transfectada com os genes codificantes de TLR4 e da molécula acessória MD-2 humanos (HEK293-TLR4/MD-2), foram cedidas gentilmente pelo Laboratório Imunopatologia - Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR - FIOCRUZ em Minas Gerais (Latz *et al.*, 2002).

As células HeLa e MDBK foram mantidas em garrafas de cultura (Sarstedt - Alemanha), em meio RPMI 1640 (Gibco - USA) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB- Gibco-USA), 100 UI/mL de penicilina (Sigma – USA) e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma – USA) e incubadas a 37°C. As células HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 foram mantidas em garrafas de cultura (Sarstedt - Alemanha), em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – Gibco - USA) suplementado com 10% (v/v) SFB, 10 mg/L ciprofloxacina (Sigma - USA), 0,5 mg/mL, G418 (Geneticina - Gibco - USA). Os cultivos foram mantidos em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂.

2.3 – Perfil de expressão de TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 em células epiteliais

A avaliação da expressão constitutiva de TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 pelas células HeLa e MDBK foi feita por qRT-PCR em tempo real. Para isso, de cada linhagem celular usada nos experimentos, foi feita extração de RNA total usando TRIzol Reagent® (Invitrogen – Carlsbad - USA) de acordo com orientações do fabricante. Os ensaios de PCR em tempo real foram precedidos de transcrição reversa das

amostras de RNA usando o kit TaqMan Reverse Transcription (Applied biosystems, Foster City, CA, USA). Para a síntese do cDNA, foram usados 1500 ng de RNA, em 20 µL de uma solução contendo tampão de transcrição reversa, 5,5 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, 2,5 µM de *random hexamer*, 1,25 U/µL de transcriptase reversa. Os primers usados na PCR em tempo real estão descritos na tabela 1.

2.4 - Infecções das linhagens celulares

As infecções das linhagens celulares foram feitas segundo Cottorello (2006) e de acordo com a descrição a baixo. As linhagens celulares HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 foram repicadas em placas de 6 poços (Sarstedt - Alemanha) em uma concentração de $1,2 \times 10^6$ células/poço e incubadas por 18 horas a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂. Após atingirem a confluência, as monocamadas foram infectadas com a amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3, usando a multiplicidade de infecção (MOI) de 500 bactérias/célula. Para verificar se a indução da transcrição de mRNA para CXCL8 ocorria via TLR foi realizado um primeiro experimento usando os tempos de incubação de 2 e 6 horas pós-infecção das células HeLa e HEK293 com *C. fetus* subsp. *venerealis* P3. Para verificar o perfil de transcrição de mRNA para CXCL8 e a participação dos TLR na indução da transcrição foi realizado um segundo experimento onde foram usados os tempos de incubação de 2, 6 e 12 horas pós-

infecção das células MDBK e HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 com *C. fetus* subsp. *venerealis* P3. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos por três vezes.

2.5 - Extração de RNA e confecção de cDNA

Após cada tempo de incubação foi realizada a extração de RNA total da monocamada de células infectadas e de células controle usando o TRIzol Reagent[®] de acordo com as orientações do fabricante. O RNA foi armazenado a -80°C até a sua utilização. O cDNA foi confeccionado usando o kit TaqMan Reverse Transcription Reagents, seguindo as especificações do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram verificadas por espectrofotometria. Foi usada uma concentração de 1500 ng de RNA, em uma reação com volume final de 20 µL. O cDNA foi estocado a -20°C até seu uso.

2.6 - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A determinação quantitativa dos níveis de transcrição dos genes de interesse, foi feita por PCR em tempo real (qRT-PCR) usando o kit SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems – USA) e o termociclador da Applied Biosystems modelo 7500. Os iniciadores usados estão descritos na Tabela 1. Os resultados foram obtidos em valores de limiar de detecção (Ct - *cycle threshold*).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para análise da qRT-PCR

Gene	Iniciador	Tamanho do produto	Número de acesso
Humano			
¹ TLR2	5'TCTCCCAGTGTTTGGTGTG3' 5 AGCAGTGAAAGAGCAATGGG'3'	107	NC_000004.1 1
¹ TLR4	5'TCAACCAAGAACCTGGACCT3' 5'TGTCTGGATTTACACCTGG3'	108	NC_000009.1 1
¹ TLR5	5'ACAACGAGGATCATGGGAGA3' 5'GGTGAGGTTGCAGAAACGAT	107	NC_000001.1 0
² CXCL8	5'ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC3' 5'AACCCTCTGCACCCAGTTTTTC3'	103	NC_000004.1 1
³ GAPDH	5' ATGGGGAAGGTGAAGGTCG 3' 5'GGGGTCATTGATGGCAACAATA3'	111	NC_000012.1 1
Bovino			
¹ TLR2	5'AAATTCTGCTGCGTTGGTTT3' 5'GGCATTGTCCAGTGATTTGA3'	96	NC_007315.3
¹ TLR4	5'GACCCTTGCGTACAGGTTGT3' 5'GGTCCAGCATCTTGGTTGAT'3	103	NC_007306.3
¹ TLR5	5'TCAATGGGAGCCAGATTTTC3' 5'CCCAGCAAAGGTGTGGTAGT3'	104	NC_007314.3
² CXCL8 (IL-8)	5'ACACATTCCACACCTTTCCACC3' 5'GCAGACCTCGTTTCCATTGGTAAG3'	105	NC_007304.3
³ GAPDH	5'ATGGTGAAGGTCCGAGTGAACG3' 5'TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC3'	109	NC_007303.3

1 - TLR – *Toll-like receptor*; 2 - CXCL8 - Interleucina 8; 3 - GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

2.7 - Análises estatísticas

Para a avaliação quantitativa do nível de transcrição de mRNA por PCR em tempo real usou-se o método de comparação dos valores de Ct (Livak e Schmittegen, 2001) no qual o gene GAPDH foi usado como normalizador. O cálculo do ΔCt foi feito a partir dos valores de Ct de cada amostra. Em cada ciclo de amplificação a amostra apresenta amplificação exponencial, no qual o ΔCt refere-se à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra para o gene controle (GAPDH), e o $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse (expressão em determinado tempo) e o ΔCt da amostra calibradora (cotrole).

Os dados obtidos foram ajustados sendo considerado cada 3,3 ciclos de amplificação dos genes alvos (TLR, MD-2 e CXCL8) a mais que o do gene normalizador (GAPDH), 10X menos cópias de mRNA transcritos para os genes alvos do que para GAPDH (Durham e Chinnery, 2006). Em seguida foi realizada a análise de variância não-paramétrica usando o Sistema para Análises Estatísticas - SAEG[®] (Funarbe, Brasil) e as médias obtidas em cada tempo foram comparadas usando o Teste de Wilcoxon e Teste de Kruskal-Wallis (Sampaio, 1998).

3 – RESULTADOS

3.1 – Perfil de expressão TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 em células epiteliais

Os resultados da avaliação do perfil de expressão constitutiva dos genes TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Linhagens celulares e seus respectivos *Toll-like receptors* expressos e molécula acessória MD-2

Linhagem celular	Origem celular	TLR2	TLR4	MD-2	TLR5
HEK293	rim de feto humano	-	-	-	-
HeLa	carcinoma cervical humano	+	+	+	-
MDBK	rim de bovino	-	+	-	+

+ Presente; - Ausente; TLR - *Toll-like receptor*; MD-2 – molécula acessória; HeLa (ATCC – CCL2™); MDBK (ATCC - CCL22™); HEK293 (ATCC - CRL1573™)

3.2 – Expressão de mRNA para CXCL8 nas linhagens celulares HeLa e HEK293 infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* P3

O gráfico 1 mostra o resultado da análise quantitativa da transcrição de mRNA para CXCL8 nas linhagens celulares HeLa e HEK293 infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* P3. Nas células HEK293

infectadas a expressão não foi significativa quando comparada com as células HeLa demonstrando a participação de TLR na indução da transcrição de mRNA para CXCL8. Foi observado aumento significativo da transcrição de mRNA para CXCL8 em células HeLa, confirmando a participação de TLR na indução e aumento da expressão de mRNA para essa quimiocina.

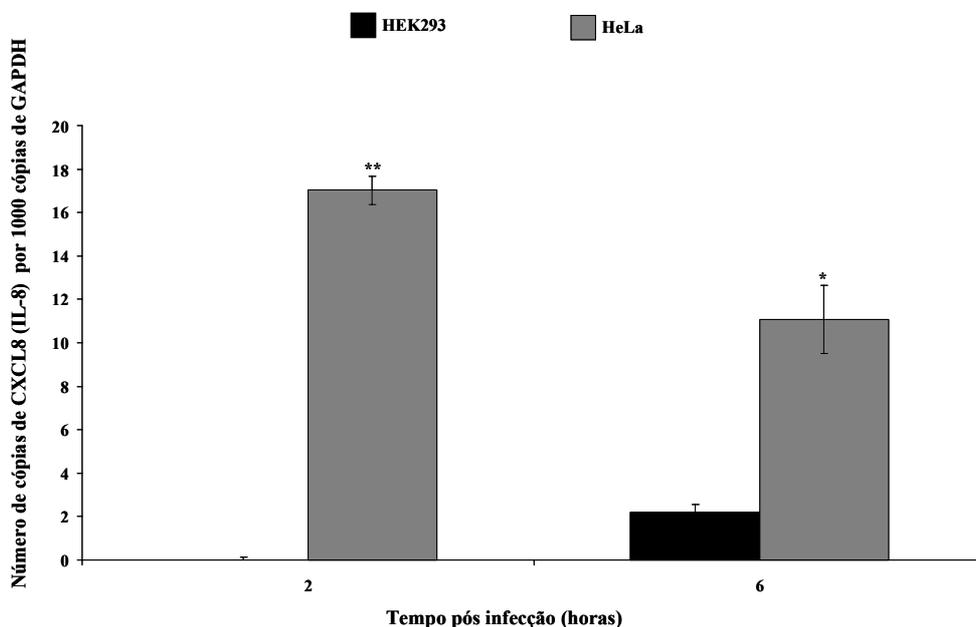


Gráfico 1: Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células HeLa e HEK293 com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (MOI de 500 bactérias/célula). Asterisco indica diferença significativa na transcrição de mRNA para CXCL8 em células HeLa em tempos diferentes ($P < 0,05$). As barras representam erro padrão.

3.3 - Expressão de mRNA para CXCL8, TLR4 e TLR5 em células MDBK infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* P3

O gráfico 2 demonstra que a transcrição de mRNA para CXCL8 em células MDBK não foi significativa, apesar de diferenças no número de cópias de mRNA para essa

quimiocina poderem ser observadas entre os tempos testados.

A cinética de transcrição de TLR4 e de TLR5 em células MDBK é mostrada no gráfico 3. Não foi observado aumento significativo da transcrição de TLR4 e TLR5 em resposta a infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* em células MDBK.

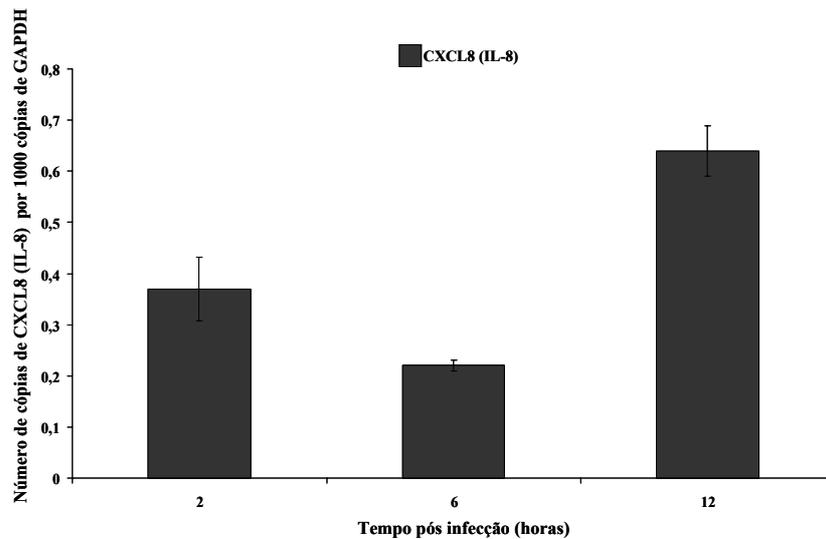


Gráfico 2: Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção de células MDBK com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. (MOI de 500 bactérias/célula). Asterisco indica diferença significativa na transcrição de mRNA para CXCL8 entre os tempos ($P < 0,05$). As barras representam erro padrão.

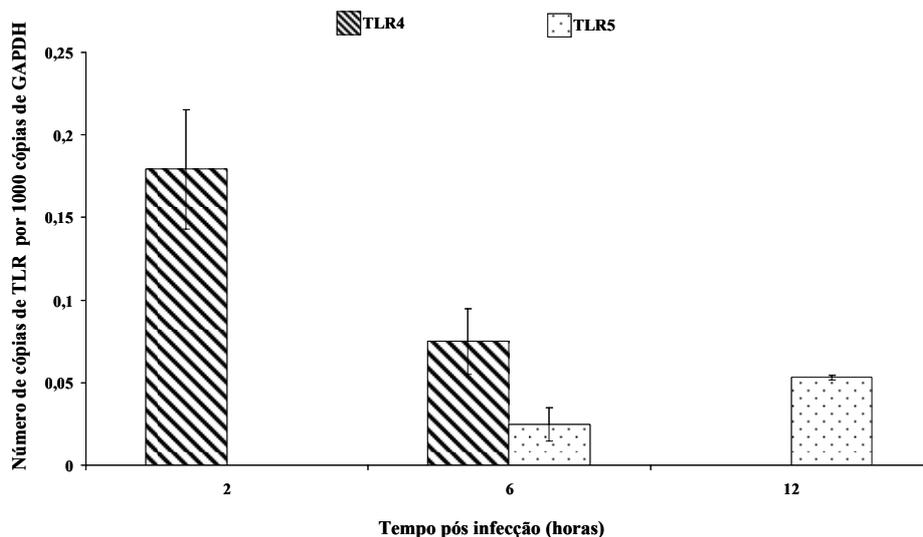


Gráfico 3: Expressão de mRNA para TLR4 e TLR5 após infecção de células MDBK com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (MOI de 500 bactérias/célula). Número diferente de asteriscos indica diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$). As barras representam erro padrão.

3.4 - Transcrição de mRNA para CXCL8 em células HEK293 e HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* P3

O gráfico 4 apresenta o perfil da transcrição de mRNA para CXCL8 por células HEK293, HEK293-TLR2 e HEK293-TLR4/MD-2 infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* P3.

O número de cópias de mRNA para CXCL8 não foi significativo em células HEK293 e HEK293-TLR4/MD-2 infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* P3, em nenhum dos tempos testados. As células HEK293-TLR2 infectadas apresentaram aumento significativo de transcrição de mRNA para CXCL8 (Gráfico 4).

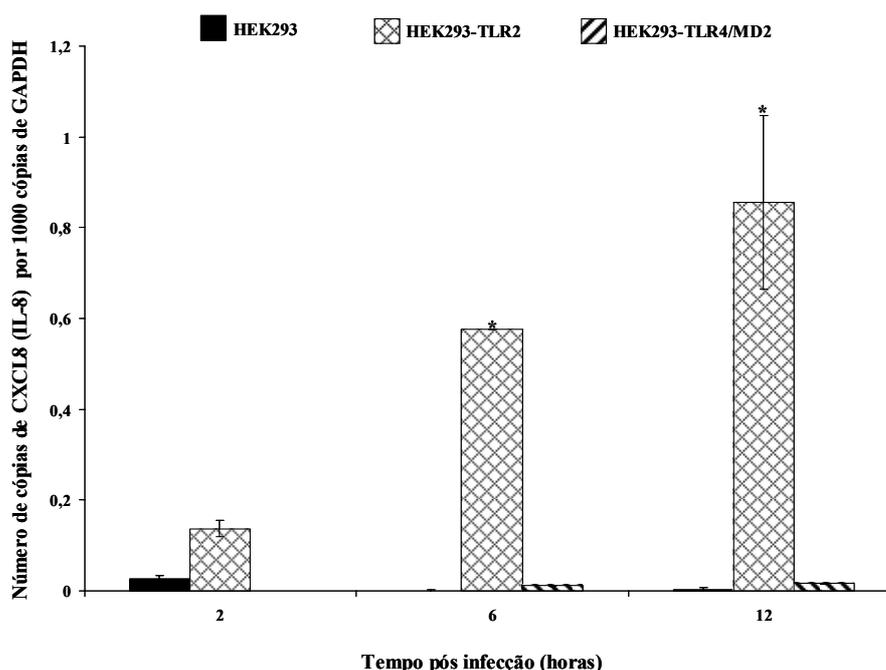


Gráfico 4: Expressão de mRNA para CXCL8 em células HEK293, HEK293-TLR2, HEK-293-TLR4/MD-2 após infecção com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. (MOI de 500 bactérias/célula). * indica diferenças significativas entre os tempos ($P < 0,05$). As barras representam erro padrão

4 – DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram usadas diferentes linhagens de células epiteliais como modelo de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* e avaliada a participação de receptores semelhantes ao *Toll* na indução da transcrição de mRNA para CXCL8. *C. fetus* subsp. *venerealis* é uma bactéria não invasiva que adere rapidamente às células epiteliais. Estudos têm demonstrado que já nas primeiras horas de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis*

ocorre a produção de mRNA para CXCL8, um potente quimiotático para células do sistema imunológico (Cottorello, 2006).

Como foi observado no gráfico 1, existe forte indicativo de que os TLR participam da indução da transcrição de mRNA para CXCL8, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa no número de cópias de mRNA para CXCL8 entre as células HeLa, que expressam TLR2 e TLR4 na superfície da membrana citoplasmática, e HEK293 que não possuem TLR expressos

constitutivamente. Deve-se ressaltar que nas células HEK293, a observação de baixa transcrição de CXCL8 possa ter sido induzida pelo reconhecimento de *C. fetus* subsp. *venerealis* por outros receptores diferentes daqueles avaliados nesse estudo (Roitt, 2005).

A linhagem MDBK, proveniente de células epiteliais de rim bovino foi usada como modelo de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* para verificar a transcrição de mRNA para CXCL8, pois expressa constitutivamente TLR4 e TLR5 mas não expressa TLR2 e a molécula acessória MD-2 (Tabela 2). Os resultados mostraram transcrição baixa de mRNA para CXCL8 (Gráfico 2) nas células MDBK indicando o não reconhecimento dos PAMP bacterianos por TLR e que a baixa transcrição observada ocorreu via outros mecanismos diferentes daqueles avaliados nesse estudo. Além disso, nosso estudo demonstrou que TLR5 não foi capaz de reconhecer o flagelo de *C. fetus* subsp. *venerealis* e consequentemente não ativou a cascata sinalizadora que leva à transcrição de mRNA para CXCL8 pelas células infectadas.

Sabemos que bactérias espiraladas, não só do gênero *Campylobacter*, mas também dos gêneros *Helicobacter* e *Arcobacter* são extremamente adaptadas a sobreviver em superfícies mucosas do hospedeiro, sendo sua motilidade muito importante na adesão e consequentemente na colonização do hospedeiro. O flagelo é de grande importância por estar envolvido na motilidade, quimiotaxia, secreção de proteínas e por ajudar na evasão da resposta imunológica inata (Guerry, 2007). O domínio D0-D1 N-terminal da flagelina tem papel crucial no reconhecimento por TLR5 além de serem essenciais para a montagem dos filamentos e motilidade bacteriana. Estudos têm demonstrado que a substituição de oito aminoácidos nessa região, localizada entre os aminoácidos 89-96 impede o reconhecimento por TLR5 em α e β Protobactérias, como *Campylobacter* sp. e *H. pylori*, mas não torna o flagelo não funcional (Andersen-Nissen *et al.* 2005) e ajuda na evasão ao sistema imunológico,

permitindo assim, uma colonização eficiente. Através de uma análise de componentes principais foi observado que existe uma associação fraca entre a transcrição de mRNA para CXCL8 e TLR5 corroborando com os resultados obtidos nos quais foi verificada produção baixa de CXCL8 (Dados não mostrados- Asensio, 1989).

Como as células MDBK não expressam constitutivamente TLR2 e o TLR4 está inativo pela ausência de MD-2 nesta célula, as células HEK293-TLR2 e HEK293-TLR4/MD-2 infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 foram usadas para o estudo da via de sinalização (Gráfico 4). Em células HEK-TLR2 a transcrição de mRNA para CXCL8 foi significativa a partir de 6 horas. A indução de expressão desta quimiocina pode estar relacionada à lipoproteína de membrana presente na superfície externa de *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 ou secretada para o meio, potencializando a resposta do hospedeiro.

A amostra P3 repassada por três vezes em novilhas virgens apresenta um aumento significativo na expressão de uma lipoproteína que está relacionada à adesão celular (Stynen, 2009). Giambartolomei *et al.* (2004), Zang *et al.* (1998) observaram que a presença de lipoproteínas de bactéria Gram negativo provoca o aumento da expressão de CXCL8. Esses dados, associados ao aumento da lipoproteína de *C. fetus* subsp. *venerealis* na infecção *in vivo*, corroboram para a possível participação da lipoproteína observada na amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 na indução da transcrição de mRNA para CXCL8 via TLR2 por células epiteliais infectadas.

Nas células HEK293-TLR4/MD-2 foi observada transcrição baixa de mRNA para CXCL8 que não foi significativa em nenhum dos tempos testados (Gráfico 4). Esse resultado pode ser comparado com a transcrição para a mesma quimiocina vista nas células HEK293, que não possuem nenhum dos TLR expressos constitutivamente. Em conjunto esses dados sugerem que o LPS de *C. fetus* subsp. *venerealis* não é reconhecido por TLR4/MD-

2. Estudos têm demonstrado que o LPS do *C. fetus* subsp. *venerealis* é semelhante ao de *C. jejuni*, e possui baixos níveis de atividade endotóxica quando comparado com o de outras enterobactérias, o que justifica os achados no presente estudo (Moran *et al.*, 1994).

5 - CONCLUSÕES

- *C. fetus* subsp. *venerealis* estimulou a expressão de mRNA para CXCL8 via TLR2 em células epiteliais *in vitro*.
- LPS e o flagelo de *C. fetus* subsp. *venerealis* não estimula a produção de CXCL8 em células epiteliais *in vitro* via TLR4/MD-2 e TLR5 respectivamente.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K.D.; STROBE, K.L. *et al.* Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 102, n. 26, p. 9247-9252, 2005.

ASENSIO, L.J. Técnicas de análise de dados multidimensionales. Madri: neografis, 1989, 301p.

COTTORIELLO, A.C.P. *Relação parasita – hospedeiro na infecção de células epiteliais in vitro por Campylobacter fetus subsp. venerealis*. 2006. 76p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

DEKEYSER, J. Bovine Genital Campylobacteriosis. In: BUTZLER, J.P. *Campylobacter infection in man and animals*. Boca Raton: CRC Press, 1984. p 181–191.

DUNN, B.E.; BLASER, M.J.; SNYDER, E.L. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membrane proteins. *Infect. Immun.*, v. 55, n. 7, p. 1564-1572, 1987.

DURHAM, S.E.; CHINNERY, P.F. Mitochondrial DNA analysis. In: M. Tevfik Dorak (Ed.). *Real-Time PCR*. Taylor & Francis Group, 2006, p. 183-204.

GIAMBARTOLOMEI, G.H.; ZWERDLING, A.; CASSATARO, J. *et al.* Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol.*, v. 173, p. 4635-4662, 2004.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.*, v. 15, n. 10, p. 456-461, 2007.

JOHNSON, W.M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.*, v. 4, p. 115-126, 1988.

LATZ, E.; VISINTIN, A.; LIEN, E. *et al.* Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the golgi apparatus with the Toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.*, v. 277, v. 49, p. 47834-47843, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.JR. Innat immunity impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 9, p. 4-9, 1997.

MIRANDA, K.L. Prevalência da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos de corte no Brasil – 2000. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2005.

MORAN, A.P.; O'MALLEY, D.T.; KOSUNEME, T.U. *et al.* Biochemical characterization of *Campylobacter fetus* Lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 9, p. 3922-3929, 1994.

PEI, Z.; BURUCOA, C.; GRIGNON, B. *et al.* Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 938–943, 1998.

OIE-World Organization for Animal Health, 2009. Disponível em: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines. Acesso em: 10 dez 2009.

RIOS, P.A.G.M. Aderência e invasibilidade em células HeLa de amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de animais. 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (Eds.) *Imunologia* 6Ed. São Paulo: Manole, 2005, 481p.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 208p.

STOESSEL, F. Las enfermedades venereas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital. Zaragoza Acribia, 1982.

STYNEN, A.P.R. *Análise proteômica e de virulência de Campylobacter fetus subsp. venereali após infecção experimental em novilhas*. 2009. 69p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: NACHAMKING, N.; BLASER, M.J. (Eds.) *Campylobacter* 2Ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 3-20.

WERLING, D.; JUNGI, T.W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 91, n.1, p. 1-12, 2003.

WERLING, D.; PIERCY, J.; COFFEY, T.B. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination? *Vet Immunol. Immunopathol.*, v. 112, p. 2-11, 2006.

ZANG, H.; NIESEL, D.W.; PETERSON, J.W. *et al.* Lipoprotein release by bacteria: potential factor in bacterial pathogenesis. *Infect. Immun.*, v. 66, n. 11, p. 5196-5201, 1998.

CAPÍTULO 3

***Tritrichomonas foetus* estimula a produção de mRNA para CXCL8 via
TLR4/MD-2**

RESUMO

O *Tritrichomonas foetus*, agente etiológico da tricomonose genital bovina, é um protozoário anaeróbico facultativo do trato genital de bovinos. A tricomonose bovina é uma doença de distribuição mundial que provoca sérios problemas na esfera reprodutiva. O reconhecimento de *Padrões Moleculares Associados aos Patógenos* por receptores *Toll-like receptor* ativa a resposta imune inata, considerada a primeira linha de defesa contra patógenos. O objetivo desse trabalho foi avaliar as modificações no padrão de transcrição de mRNA para CXCL8 e a participação dos receptores TLR2, TLR4/MD-2 e TLR5 na indução de resposta imune inata em diferentes células epiteliais infectadas por *T. foetus*. Foram usadas células HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 na concentração de 4×10^5 células/mL com uma MOI variada e incubadas por 6, 9, 12, 18, 21 e 24 h. A determinação do número de cópias de mRNA produzidas em resposta à infecção foi realizada por PCR em tempo real, na qual iniciadores específicos para GAPDH, CXCL8, TLR2, TLR4, MD-2 e TLR5 foram usados. Foi observado aumento na transcrição mRNA para CXCL8 no tempo de 18 h nas células HeLa e HEK293-TLR4/MD-2. A importância da presença da molécula acessória MD-2 na indução da transcrição de CXCL8 foi demonstrada. Esse resultado sugere que a transcrição desta quimiocina está relacionada ao reconhecimento do patógeno por TLR4/MD-2.

Palavras chave: *Tritrichomas foetus*, tricomonose genital bovina, CXCL8 (IL-8), *Toll-like receptor*, células epiteliais.

ABSTRACT

The *Tritrichomonas foetus*, etiologic agent of bovine genital trichomoniasis, is an anaerobic protozoa of bovine genital tract. Bovine trichomoniasis is a disease of worldwide distribution that causes serious problems in the reproductive sphere. The recognition of the Pathogen associated molecular patterns by Toll-like receptors activates the receptor of innate immune response, considered the first line of defense against pathogens. The aim of this study was to evaluate the changes in the pattern of mRNA transcription for CXCL8 and the involvement of TLR2, TLR5 TLR4/MD-2 receptors in the induction of innate immune response in different epithelial cells infected by *T. foetus*. The cells used were HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2, at a concentration of 4×10^5 cells/mL with different MOI and incubated for 6, 9, 12, 18, 21 and 24 h. The number of copies of mRNA produced in response to infection was determined by quantitative real time PCR (qRT-PCR) in which specific primers for GAPDH, CXCL8, TLR2, TLR4, TLR5 and MD-2 were used. We observed an increase in CXCL8 mRNA transcription at the time of 18 h in HeLa and HEK293-TLR4/MD-2 cells. The importance of MD-2 accessory molecule in the induction of CXCL8 transcription was demonstrated. The result suggests that the transcription of this chemokine is related to pathogen recognition by TLR4/MD-2.

Keywords: *Tritrichomas foetus*, bovine genital trichomoniasis, CXCL8 (IL-8), Toll-like receptor, epithelial cell.

1 - INTRODUÇÃO

Tricomonose genital bovina (TGB) é uma doença sexualmente transmissível, causada pelo *Tritrichomonas foetus*, um protozoário piriforme, flagelado, extracelular, parasita obrigatório, anaeróbico facultativo, que pode se apresentar na forma de pseudocisto (Skirrow e BonDurant, 1988; Petrópolis *et al.*, 2008). É transmitido do touro para a vaca na monta natural ou pelo uso de sêmen contaminado (Skirrow e BonDurant, 1988). Possui distribuição mundial, principalmente em países onde existem grandes rebanhos que utilizam a monta natural como forma reprodutiva (BonDurant 1993; OIE, 2009) e tem sido implicada como causa importante de perdas econômicas em rebanhos tanto de corte quanto leiteiros (Goodger e Skirrow, 1986). As manifestações clínicas da infecção acontecem principalmente nas vacas e são repetições de cio com intervalos irregulares e aumentados, vaginites, cervicites, endometrites, piometra, morte embrionária ou fetal, feto macerado e aborto (Rae, 1989).

A interação do protozoário com a camada epitelial vaginal é crucial para o estabelecimento da TGB, sendo esta a primeira barreira contra o patógeno. O epitélio vaginal é constituído por células escamosas queratinizadas e com o pH em torno de 6,5 favorecendo a colonização do *T. foetus*, com subsequente, infecção persistente e infiltrado de células inflamatórias subepiteliais (Corbeil *et al.*, 1989).

O *T. foetus* possui uma variedade de glicoconjugados, relacionados com a aderência às células do hospedeiro, proporcionando a evasão do sistema imune e sendo altamente imunogênicos (Singh, 1993). Benchimol *et al.* (1981) demonstraram a presença de glicocálix e ácido siálico na membrana externa do *T. foetus*, mostrando que a carga superficial varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e da patogenicidade dos parasitos. *T. foetus* produz proteinases

extracelulares capazes de clivar imunoglobulinas do tipo G, importantes para a defesa do trato reprodutivo das vacas (Talbot *et al.*, 1990). Burgess e McDonald (1992) identificaram na superfície do parasito, glicoconjugados de aproximadamente 190 kDa denominados antígeno TF190 relacionada com a adesão do parasita. Singh *et al.* (1994) caracterizou o glicoconjugado denominado lipofosfoglicano (LPG) de *T. foetus* (TF-LPG) de aproximadamente 50 a 70 kDa.

Em resposta a presença deste microrganismo aderido as células epiteliais no hospedeiro, ocorre uma resposta de caráter rápido do sistema imune inato. Nas células se encontra receptores que são capazes de reconhecerem padrões moleculares associados ao patógeno (Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMP) e têm um papel essencial no sistema imune inato por iniciar e direcionar a resposta imune. Esses receptores designados de *Toll-like receptors* (TLR) são um grupo de proteínas altamente conservadas que têm sido identificadas em diversos organismos tais como insetos e mamíferos (Medzhitov e Janeway, 1997). Os TLR reconhecem

O TLR4 juntamente com moléculas acessórias MD-2 e o co-fator CD14 estão envolvidos com a expressão de citocinas inflamatórias na resposta a lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria Gram-negativo e lipopeptídeofosfoglicano (LPPG) e LPG, que é o maior componente de membrana externa de protozoários (Medzhitov e Janeway, 1997; Benchimol, *et al.*, 2002; Maldonado-Bernal *et al.*, 2005). Na ausência de MD-2 o TLR4 se torna afunacional não respondendo a presença de LPS e ou LPG. O TLR2 participa no reconhecimento de peptídeoglicanos e lipoproteínas bacterianas (Werling *et al.*, 2006), LPPG e LPG de protozoários (Benchimol *et al.*, 2002; Maldonado-Bernal *et al.*, 2005). O TLR5 reconhece flagelina presente em bactérias e não se sabe se reconhece flagelo de protozoários (Werling *et al.*, 2006). Os TLR ao interagirem com os PAMP, iniciam uma cascata sinalizante que

ativa diretamente o NF- κ B, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias (Kunkel *et al.*, 1997).

É de grande importância a compreensão da interação de *T. foetus* com as células epiteliais, para compreender a cinética de expressão de CXCL8 e a via desta expressão, os quais são de extrema relevância no entendimento da patogenia da TGB. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as modificações no padrão de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) e TLR por diferentes células epiteliais infectadas por *T. foetus*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Cultivo do protozoário

Para realização do experimento foi usada a amostra de *T. foetus* 04/417 isolada de uma vaca, oriunda do Laboratório de Patologia Veterinária – INTA (Balcarce, Argentina). Esta amostra estava estocada em criotubo contendo meio *Diamond* (Diamond, 1957) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco - USA) e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma - USA), em nitrogênio líquido. O microrganismo estava em uma concentração de 1×10^6 protozoários/mL. O *T. foetus* foi descongelado a 37°C em banho-maria por 15 minutos e em seguida foi centrifugado a 3800 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de meio *Diamond* suplementado com 10% de SFB, mais 500 UI/mL de anfotericina B, 1 mg/mL de estreptomicina e 1.000 UI/mL de penicilina e incubado em estufa a 37°C por 2 horas.

Em seguida os protozoários foram centrifugados a 3800 X g por 10 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado 5 mL de meio *Diamond* suplementado com 10% de SFB mais 500 UI/mL de anfotericina B, 1 mg/mL de estreptomicina (Sigma – USA) e 1.000 UI/mL de penicilina (Sigma – USA) e incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Após atingir a fase logarítmica, os parasitos foram crescidos e avaliados a fresco, observando a motilidade e

concentração em microscópio de campo escuro.

Depois de cultivados, os protozoários foram lavados por centrifugação a 3800 X g por 10 minutos, duas vezes em tampão salina fosfatada pH 7,4 (PBS, 0,01M PO₄ e 0,15M NaCl). Em seguida foi retirada uma alíquota para realizar a contagem e a outra parte foi reservada para a realização dos experimentos. Foi realizado uma diluição de 1:10 em PBS (pH 7,4) com formol a 10% e os protozoários foram contados em câmara de *Neubauer*. Em seguida a concentração dos protozoários foi ajustada para cada experimento.

2.2 - Cultivos das linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de célula HeLa (*American Type Culture Collection* – ATCC – CCL2™) originária de carcinoma cervical humano, MDBK (ATCC - CCL22™) originária de rim de bovino saudável, HEK293 (ATCC - CRL1573™) originárias de rim de feto humano, HEK293-TLR2 e HEK293-TLR4/MD-2 humano (Latz *et al.*, 2002).

As células HeLa e MDBK foram mantidas em garrafas de cultura (Sarstedt - Alemanha), em meio RPMI 1640 (Gibco - USA) suplementado com 5% (v/v) de SFB, com 100 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C. As células HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 foram mantidas em garrafas de cultura (Sarstedt - Alemanha), em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – Gibco - USA) suplementado com 10% (v/v) SFB, 10 mg/L ciprofloxacina (Sigma - USA), 0,5 mg/mL, G418 (Geneticina - Gibco - USA). Os cultivos foram mantidos em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂.

2.3 - Perfil de expressão de TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 em células epiteliais

Para verificar o perfil de expressão constitutivo de TLR2, TLR4, TLR5 e MD-2 nas linhagens celulares HeLa e MDBK, foi

realizado uma extração de mRNA de cada linhagem sem infecção com a utilização de TRIzol Reagent® (Invitrogen – Carlsbad - USA) seguindo as orientações do fabricante.

2.4 - Determinação da multiplicidade de infecção (MOI) e tempos para ensaios de expressão mRNA para CXCL8 e TLR em células epiteliais infectadas com *T. foetus*

Para a determinação da multiplicidade de infecção (MOI) ideal, foi testado nas linhagens celulares HeLa, MDBK, HEK293, HEK-TLR2 e HEK293-TLR4/MD-2 e a amostra de *T. foetus* em multiplicidade de infecção de 0,05, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 protozoário por célula. As monocamadas foram incubadas em atmosfera contendo 5% de CO₂ e observadas nos tempos de 2, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas em microscopia para verificação da integridade da monocamada.

2.5 - Infecções das linhagens celulares

As linhagens celulares HeLa, MDBK, HEK293, HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD2 foram repicadas em placas de 6 poços (Sarstedt - Alemanha) em uma concentração de 1,2x10⁶ células/poço e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂ por 18 horas, cada uma com seu meio de cultivo adequado. Após atingirem a confluência, foram realizados os seguintes procedimentos: para verificar se o *T. foetus* induzia a expressão de mRNA para CXCL8 foi utilizada a linhagem células HeLa com os tempos de incubação: 6, 12, 18 e 24 horas, com MOI de 5 protozoários/célula. Para verificar a participação dos TLR, foram utilizadas as células HeLa e HEK293 nos tempos de incubação: 12 e 18 horas. Para este experimento foi utilizada uma MOI de 0,05 protozoário/célula.

Para verificar a expressão de mRNA para CXCL8 e se ocorria a participação dos TLR4, TLR5 foi utilizada as células MDBK nos tempos de incubação: 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas utilizando uma MOI de 5

protozoários/célula. Para confirmar a participação dos TLR2 e TLR4 foram utilizadas as células HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 nos tempos de 12, 15 e 18 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos por três vezes.

2.6 - Extração de rna e confecção de cDNA

Após cada tempo de incubação foi realizada a extração de RNA total da monocamada de células infectadas e controle utilizando o TRIzol Reagent® seguindo as orientações do fabricante. O RNA foi armazenado a -80°C até a sua utilização. O cDNA foi confeccionado usando o kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems - USA), seguindo as especificações do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram verificadas por espectrofotometria. Foi usada uma concentração de 1500 ng de RNA, em uma reação com volume final de 20 µL e esta foi estocada a -20°C até seu uso.

2.7 - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para determinar os níveis de expressão dos genes de interesse, foi realizada uma reação de RT-PCR utilizando o kit SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems - USA). Os iniciadores usados estão descritos na Tabela 1. A qRT-PCR foi realizada em placas de 96 poços (Applied Biosystems - USA), onde foi adicionado uma reação com 23 µL do Master Mix e 3 µL do cDNA perfazendo um volume final de 25 µL e em seguida foram acondicionadas no termociclador (Applied Biosystems 7500). Para a amplificação do cDNA foi utilizado as seguintes condições: 50°C por 2 minutos para incubação, 95°C por 10 minutos para ativação e com 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão. Os resultados foram obtidos em valores de limiar de detecção (Ct - *cycle threshold*).

2.8 - Análises estatísticas

Para a avaliação da expressão gênica pela qRT-PCR foi utilizado o método de comparação dos valores de Ct (Livak e Schmittegen, 2001). Onde foi utilizada a expressão de GAPDH como gene normalizado. O cálculo do Δ Ct foi realizado utilizando-se o Ct de cada amostra. O ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial, o Δ Ct refere-se à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra para o gene controle (GAPDH), e o $\Delta\Delta$ Ct representam a diferença entre o Δ Ct da amostra de interesse (expressão em determinado

tempo) e o Δ Ct da amostra calibradora (cotrole).

Em seguida os dados foram ajustados, onde a cada 3,3 ciclos de mRNA para TLR e ou mRNA para CXCL8 a mais que de GAPDH, corresponde a 10X menos cópias de mRNA para TLR e ou mRNA para CXCL8 que de GAPDH (Durham e Chinnery, 2006). Em seguida foi realizada a análise de variância não-paramétrica utilizando-se o Sistema para Análises Estatísticas - SAEG® (Funarbe, Brasil) e as médias obtidas em cada tempo foram comparadas utilizando-se o Teste de Wilcoxon e Test e de Kruskal-Wallis (Sampaio, 1998).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para análise da qRT-PCR

Gene	Iniciador	Tamanho do produto	Número de acesso
Humano			
¹ TLR2	5'TCTCCCAGTGTTTGGTGTTG3' 5 AGCAGTGAAAGAGCAATGGG3'	107	NC_000004.11
¹ TLR4	5'TCAACCAAGAACCTGGACCT3' 5'TGTCTGGATTTACACCTGG3'	108	NC_000009.11
¹ TLR5	5'ACAACGAGGATCATGGGAGA3' 5'GGTGAGGTTGCAGAAACGAT	107	NC_000001.10
² CXCL8	5'ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC3' 5'AACCCTCTGCACCCAGTTTTTC3'	103	NC_000004.11
³ GAPDH	5' ATGGGGAAGGTGAAGGTCG 3' 5'GGGGTCATTGATGGCAACAATA3'	111	NC_000012.11
Bovino			
¹ TLR2	5'AAATTCTGCTGCGTTGGTTT3' 5'GGCATTGTCCAGTGATTTGA3'	96	NC_007315.3
¹ TLR4	5'GACCCTTGCCTACAGGTTGT3' 5'GGTCCAGCATCTTGGTTGAT3'	103	NC_007306.3
¹ TLR5	5'TCAATGGGAGCCAGATTTTC3' 5'CCCAGCAAAGGTGTGGTAGT3'	104	NC_007314.3
¹ TLR6	5'GGCAAGAGCATTGTGGAAA3' 5'ATAATGGCACCACTCGCTCT3'	102	NC_007304.3
² CXCL8	5'ACACATTCCACACCTTTCCACC3' 5'GCAGACCTCGTTTCCATTGGTAAG3'	105	NC_007304.3
³ GAPDH	5'ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG3' 5'TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGTTC3'	109	NC_007303.3

1 - TLR – *Toll-like receptor*; 2 - CXCL8 - Interleucina 8; 3 - GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

3 – RESULTADOS

3.1 - Efeito da multiplicidade de infecção (MOI) para ensaios de expressão mRNA para CXCL8 em células epiteliais infectadas com *T. foetus*

A multiplicidade de infecção é muito importante para se obter uma boa resposta no experimento executado. Nos experimentos realizados foram utilizadas linhagens celulares distintas tais como célula HeLa e MDBK que são de fácil aderência ao substrato das placas e não desprendem com facilidade. Já células HEK293 e as células transfectadas HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 possuem uma maior dificuldade para manter a monocamada aderida ao substrato das placas, mesmo utilizando placas com

tratamento especial. Para as células HeLa e MDBK foram utilizadas uma MOI de 5 protozoários/célula. Com as células HEK293 e HEK293-TLR2, HEK293-TLR4/MD-2 foi utilizado uma MOI de 0,05 protozoário/célula devido a movimentação dos protozoários no poço até sua adesão na superfície da célula e conseqüentemente a monocamada se desprendia tornando o experimento inexecutável. Mesmo com um MOI de 100X menor foi possível verificar a expressão de mRNA para CXCL8.

3.2 - Expressão de receptores semelhantes a *Toll* (TLR) e molécula acessória MD-2 em células epiteliais

Os resultados da avaliação da expressão constitutiva dos genes TLR2, TLR4, TLR5 e a molécula acessória MD-2 estão sumariados na Tabela 2.

Tabela 2 – Linhagens celulares e seus respectivos *Toll-like receptors* expressos e molécula acessória MD-2.

Linhagem celular	Origem celular	TLR2	TLR4	MD-2	TLR5
HEK293	rim de feto humano	-	-	-	-
HeLa	carcinoma cervical humano	+	+	+	-
MDBK	rim de bovino	-	+	-	+

+ Presente; - Ausente; TLR - *Toll-like receptor*; MD-2 – molécula acessória; HeLa (ATCC – CCL2™); MDBK (ATCC - CCL22™); HEK293 (ATCC - CRL1573™)

3.3 – Expressão de mRNA para CXCL8 em linhagem celular HeLa infectadas com *T. foetus*

No gráfico 1 esta apresentado o resultado da expressão de mRNA para CXCL8 em linhagem celular HeLa infectadas com *T. foetus*. Foi possível observar que houve um aumento significativo na expressão em 18 horas de infecção.

3.4 - Expressão de mRNA para CXCL8 nas linhagens celulares HeLa e HEK293 infectadas por *T. foetus*

No gráfico 2 apresenta o resultado da expressão de mRNA para CXCL8 nas linhagens celulares HeLa e HEK293 infectadas por *T. foetus*. Foi possível observar que a expressão de mRNA para CXCL8 foi via TLR, pois nas células HEK293 infectada a expressão não foi significativa. Já para as células HeLa houve aumento significativo da expressão, confirmando a participação de TLR na indução e aumento da expressão de mRNA para CXCL8.

3.5 - Expressão de mRNA para CXCL8, TLR4 e TLR5 em linhagem celular MDBK infectadas com *T. foetus*

No gráfico 3 foi observado a expressão de mRNA para CXCL8, em linhagem celular MDBK infectada com *T. foetus*. Foi possível verificar que nas células MDBK ocorreu um aumento significativo na expressão de

mRNA para CXCL8 às 18 horas após infecção. Essa expressão foi bem menor que a observada em células HeLa (Gráfico 1) e não sendo significativa em relação à célula HeLa. Nesta linhagem foi observado um antagonismo de mRNA para TLR4 e TLR5 em relação ao mRNA para CXCL8 (Gráfico 4). Com este resultado ficou claro que os receptores TLR4 e TLR5 não participaram na expressão de CXCL8 nas células MDBK.

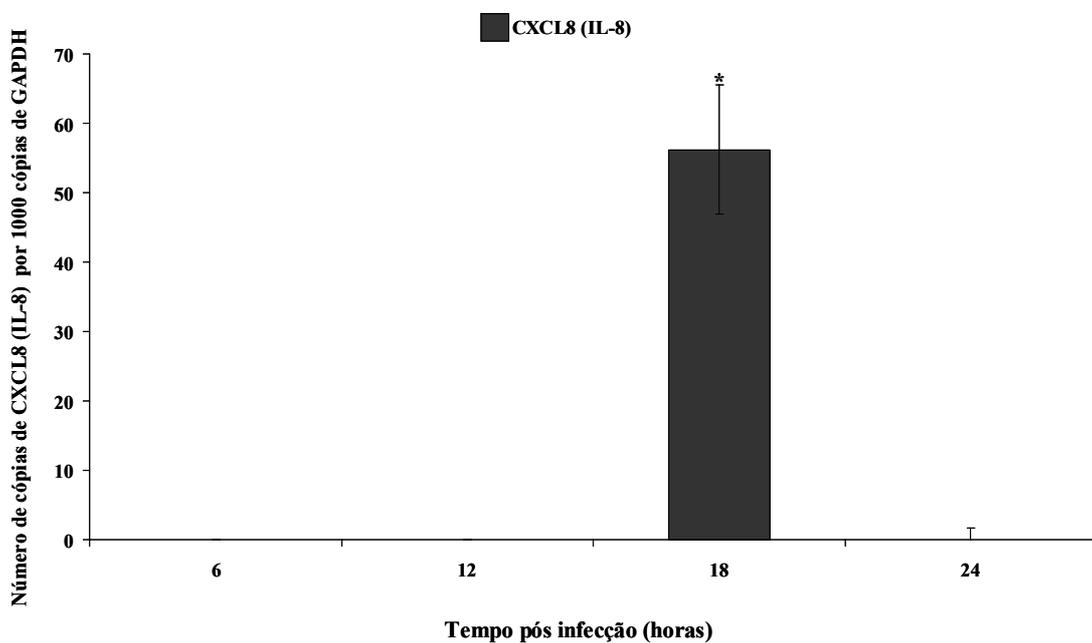


Gráfico 1: Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células HeLa com *Tritrichomonas foetus* com uma multiplicidade de infecção de 5 protozoários/célula. Asterisco indica diferença significativa na expressão de mRNA para CXCL8 entre os tempos ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão.

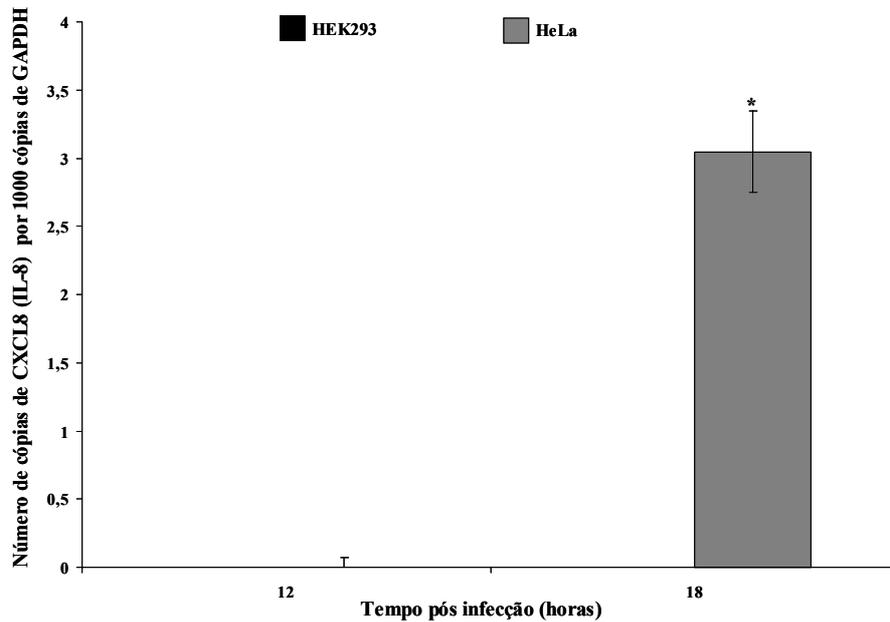


Gráfico 2: Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células HEK293 e HeLa com *Tritrichomonas foetus* com a multiplicidade de infecção de 0,05 protozoário/célula. Asterisco indica expressão de mRNA para CXCL8 significativa no tempo ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão.

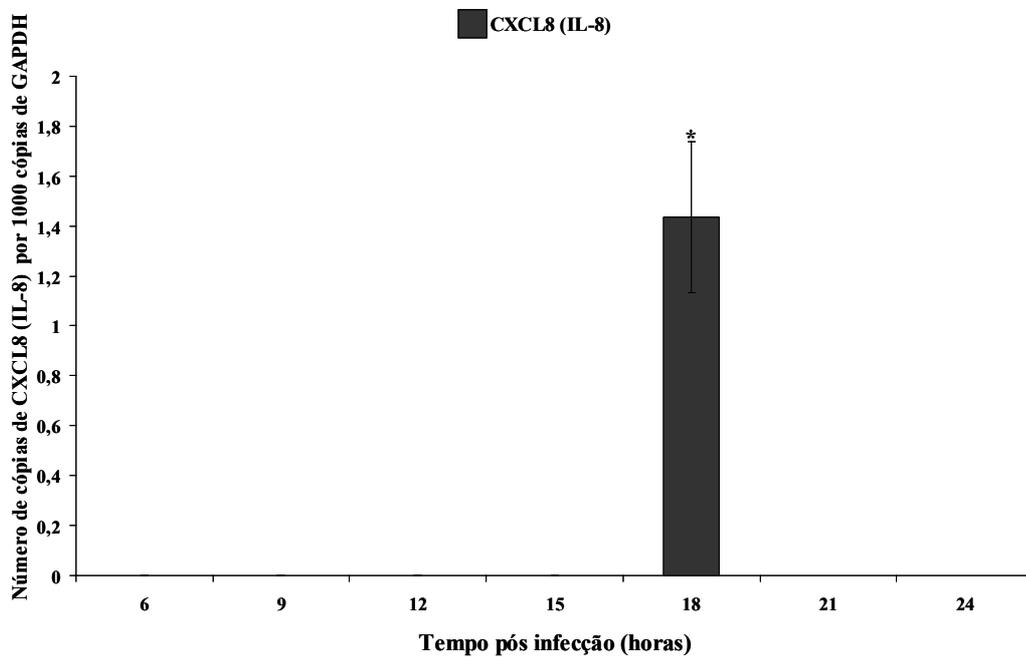


Gráfico 3: Expressão de mRNA para CXCL8 após infecção em células MDBK com *Tritrichomonas foetus* com uma multiplicidade de infecção de 5 protozoários/célula. Asterisco indica diferença significativa na expressão de mRNA para CXCL8 no tempo ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão.

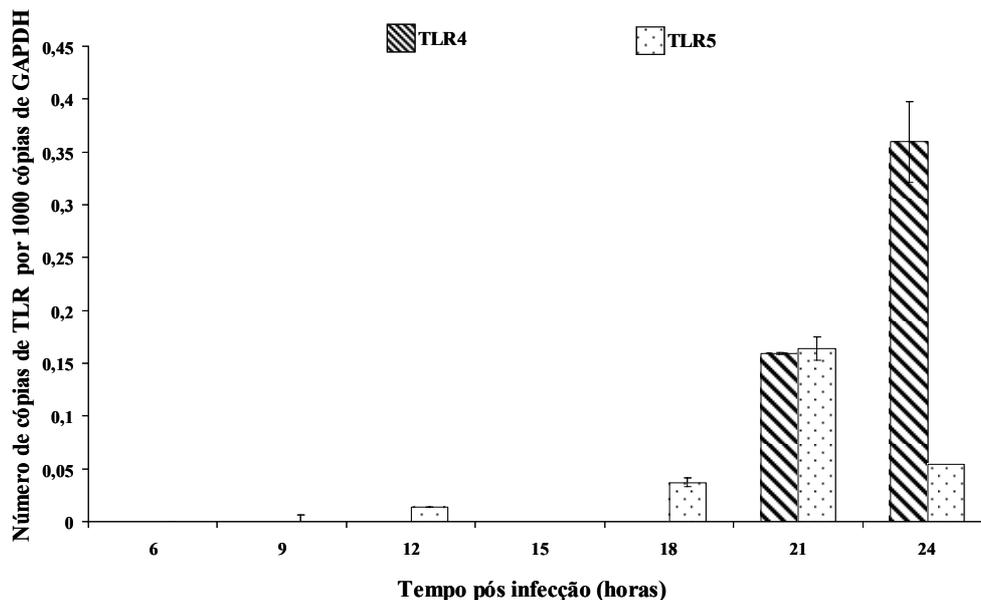


Gráfico 4: Expressão de mRNA para TLR4 e TLR5 após infecção com *Tririchomonas foetus* em células MDBK com uma multiplicidade de infecção de 5 protozoários/célula. Letras iguais indicam diferença significativa de expressão de mRNA entre os tempos ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão.

3.6 - Expressão de mRNA para CXCL8 em célula HEK293 transfectadas com TLR2 e TLR4/MD-2 infectadas com *T. foetus*.

O gráfico 5 apresenta os resultados da expressão de mRNA para CXCL8 em célula HEK293-TLR2 e HEK293-TLR4/MD-2 infectadas com *T. foetus*. Foi observado aumento significativo da expressão de mRNA para CXCL8 através da ativação de TLR4/MD-2. Mas para as células HEK293 e HEK293-TLR2 não ocorreu expressão significativamente de CXCL8 em nenhum dos tempos testados.

4 – DISCUSSÃO

No presente trabalho foram utilizadas diferentes células epiteliais como modelo de infecção com *T. foetus* para verificar a expressão de mRNA para CXCL8 e se essa expressão era ativada via receptores semelhantes a *Toll*. Após a infecção em células epiteliais com *T. foetus* ocorreu uma expressão de mRNA para CXCL8 pontual às 18 horas significativo em célula HeLa e

MDBK (Gráfico 1, 3). Esta quimiocina é uma das primeiras a ser produzida sendo potente quimiotático para células do sistema imunes tais como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos que são importantes na TGB (Roitt *et al.*, 2005).

A expressão de mRNA para CXCL8 foi mais tardia (Gráfico 1 e 3) em relação a observada em infecção por *Trichomonas vaginalis*, que tem a produção desta quimiocina aproximadamente após 1 hora de infecção (Chang *et al.*, 2006). Essa produção tardia de mRNA para CXCL8 em relação a *T. vaginalis* pode ser uma vantagem para o *T. foetus* durante a infecção, pois possibilita uma melhor colonização da mucosa do trato genital conseguindo burlar o sistema imune por um tempo maior. Este resultado explica os achados de Fichorova *et al.* (2006) que não observaram expressão de CXCL8 em células vaginais infectadas com LPG de *T. foetus* no tempo de 6 horas.

Foi possível verificar que a expressão de mRNA para CXCL8 foi estimulada via TLR com o auxílio da células HeLa e HEK293.

Isto pode ser observado pelo aumento significativo da expressão do CXCL8 mRNA nas células HeLa, positiva para TLR2, 4 e MD-2, sendo que este aumento não foi visto nas células HEK293, negativa para os TLR2, 4, 5 e MD-2. Os níveis de expressões

de mRNA para CXCL8 foram diferentes entre as linhagens celulares sendo mais expressiva nas células HeLa do que nas células MDBK (Gráfico 1 e 3), isso devido a diferença do perfil dos TLR (Tab. 2).

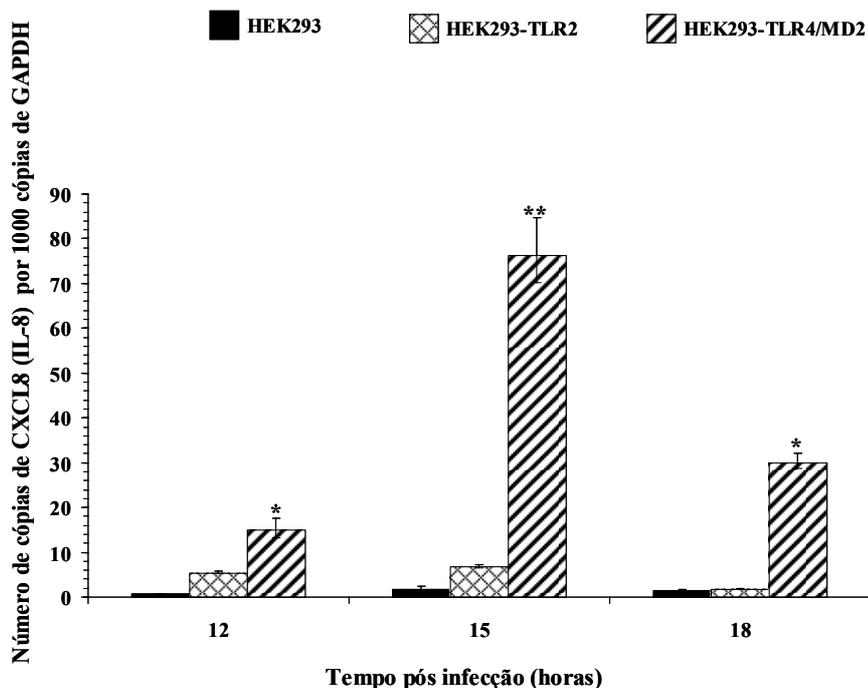


Gráfico 5: Expressão de mRNA para CXCL8 em células HEK293, HEK293-TLR2, HEK-293-TLR4/MD-2 após infecção com *Tritrichomonas foetus* com uma multiplicidade de infecção de 0,05 protozoário/célula, em função do tempo. Asterisco indica diferença significativa na expressão de mRNA para CXCL8 entre tempos diferentes ($P < 0,05$). As barras representam o erro padrão.

Na célula MDBK o TLR4 não foi ativado, pois nesta linhagem este receptor é inativo devido à ausência de expressão da molécula acessória MD-2 que forma um aglomerado com TLR4 no reconhecimento de antígenos de superfície como LPS bacteriano, LPG e LPPG de protozoários (Gráfico 4 - Medzhitov e Janeway, 1997; Maldonado-Bernal *et al.*, 2005). O TLR5 que é importante no reconhecimento de flagelina bacteriana não foi ativado na expressão de CXCL8 e na literatura não há nenhum relato de interação de flagelo de *T. foetus* com o TLR5 e sua importância na resposta imune contra este parasito. Para assegurar que o TLR4 participa da expressão de mRNA para

CXCL8 foi utilizada as células transfectadas infectadas com *T. foetus* com uma multiplicidade de infecção 100 vezes menor do que foram utilizados nas células MDBK e HeLa. Essas células são de difícil aderência e com a movimentação do protozoário a monocamada se soltava e poderia comprometer os resultados. Com essas células ficou confirmada a participação de TLR4/MD-2 após a infecção por *T. foetus*. Com esses dados fica claro que a molécula acessória MD-2 é importante no reconhecimento de proteína de membrana externa do protozoário para a expressão de CXCL8 (Gráfico 5). O TLR4/MD-2 pode estar sendo ativado por antígeno de

superfície externa, o LPG que é encontrado em grande escala neste microrganismo tanto na membrana externa quanto secretada (Singh, 1993, Singh *et al.*, 1994). Chang *et al.* (2006) observaram uma participação de TLR2 e TLR4 em um estudo com *T. vaginalis* infectando células HeLa corroborando com os nossos achados para *T. foetus* na ativação de TLR4.

Através de uma análise de componentes principais foi observado que existe uma associação forte entre a expressão de mRNA para TLR4 e TLR5 e uma fraca associação entre esses receptores e a expressão de mRNA para CXCL8 mostrando que os resultados obtidos explicam a baixa produção de CXCL8 e a não participação destes receptores nesta expressão (Dados não mostrados- Asensio, 1989). Nas células transfectadas com TLR2 não ocorreu expressão de mRNA para CXCL8 significativo. Esses resultados são de grande importância para o entendimento da patogenia da TGB, onde poderemos começar a fazer uma ligação da resposta imune inata com a resposta imune adaptativa.

5 – CONCLUSÕES

- O *T. foetus* estimula expressão de mRNA para CXCL8 em células piteliais infectadas *in vitro*;
- A expressão de mRNA para CXCL8 em células epiteliais após infecção por *T. foetus* ocorreu via TLR4/MD-2 em células epiteliais infectadas *in vitro*.

6– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENCHIMOL, M.; BERNARDINO, M.V. Ultrastructural localization of glycoconjugates in *Trichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* v. 88, p. 134-143, 2002.

BENCHIMOL, M.; PEREIRA, M.E.A; ELIAS, C.A. *et al.* Cell surface carbohydrates in *Trichomonas foetus*. *J. Protozool.*, v. 28, n. 3, p. 337-341, 1981.

BONDURANT R.H; CORBEIL R.R; CORBEIL L.B. Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Trichomonas foetus*. *Infect. Immun.*, n. 61, v. 4, p. 1385-94, 1993.

BURGESS, D.E.; MCDONALD, C.M. Analysis of adhesion and cytotoxicity of *Trichomonas foetus* to mammalian cells by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 4253-4259, 1992.

CHANG, J.O.; PARK, J.Y.; KIM, S.K. Dependence on p38 MAPK signalling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. *Immunol.*, v. 118, p. 164-170, 2006.

CORBEIL, L.B.; HODGSON, J.L.; JONES, D.W. *et al.* Adherence of *Trichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 57, n. 7, p. 2158-2165, 1989.

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* v. 43, p. 488-490, 1957.

DURHAM, S.E.; CHINNERY, P.F. Mitochondrial DNA analysis. In: Dorak, M.T (Ed.). *Real-Time PCR*. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 183-204.

FICHOROVA, R.N.; TRIFONOVA, R.T.; GILBERT, R.O. *et al.* *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 74, n. 10, p. 5773–5779, 2006.

GOODGER, W.J.; SKIRROW, S.Z. Epidemiologic and economic analysis of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 189, p. 772-776, 1986.

- KUNKEL, S.L.; LUKACS, N.W.; CHENSUE, S.W. *et al.* Chemokines and the inflammatory response. In: REMICK, D. G.; FRIEDLAND, J.S. (Ed.). *Cytokines in health and disease*. New York: M. Dekker, 1997. p. 121-131.
- LATZ, E.; VISINTIN, A.; LIEN, E. *et al.* Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the golgi apparatus with the Toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 49, p. 47834-47843, 2002.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MALDONADO-BERNAL, C.; KIRSCHNING, C.J.; ROSENSTEIN, Y. *et al.* The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol.*, v. 27, p. 127-137, 2005.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.JR. Innate immunity impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 9, p. 4-9, 1997.
- Bovine genital campylobacteriosis and Trichomonosis. OIE – World Organization for Animal Health, 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines>. Acesso em: 10 dez 2009.
- PETRÓPOLIS, D.B.; RODRIGUES, J.C.F.; AZEVEDO, B.R. *et al.* The binding of *Tritrichomonas foetus* to immobilized laminin-1 and its role in the cytotoxicity exerted by the parasite. *Microbiology.*, v. 154, p. 2283-2290, 2008.
- RAE, D.O. Impact of trichomoniasis on the cow-calf producers profitability. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 194, p. 771-775, 1989.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (Eds.) *Imunologia* 6Ed. São Paulo: Manole, 2005. 481p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 208 p.
- SMITH, M.F.JR.; MITCHELL, A.; LI, G. *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori* induced NF-κB chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 35, p. 32552-32560, 2003.
- SINGH, B.N. Lipophosphoglycan-like glycoconjugate of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 10, p. 152-154, 1993.
- SINGH, B.N.; BEACH, D.H.; LINDMARK, D.G. *et al.* Identification of the novel lipophosphoglycan-like glycoconjugates of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 309, p. 273-280, 1994.
- SKIRROW, S.Z.; BONDURANT, R.H. Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, v. 58, n. 8, p. 591-603, 1988.
- TALBOT, J.A.; NIELSEN, K.; CORBEIL, L.B. Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. San Diego: University of California, 1990. p. 384-390.
- WERLING D.; PIERCY, J.; COFFEY, T.B. Expression of Toll-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination? *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 112, p.2-11, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho relacionou a expressão de mRNA para CXCL8 em células epiteliais infectadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* que foi repassada em novilhas virgens por três vezes consecutivas para ativar a amostra (Stynen, 2009) e por *T. foetus* isolada de uma fêmea, ao reconhecimento de estruturas desses agentes por receptores semelhantes a *Toll* (TLR) existentes nas células epiteliais. Estes estudos em relação à resposta imune inata são importantes para se entender os mecanismos iniciais em infecções do trato genital por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus* e sua ligação com a resposta imune humoral, que já foi explorada por outros pesquisadores (Corbeil *et al.* 1974a; Corbeil *et al.*, 1974b; Van Aert *et al.*, 1977; Gault, 1995; Pellegrin e Leite, 2003).

Tanto *C. fetus* subsp. *venerealis* quanto o *T. foetus*, causam problemas reprodutivos em bovinos, apresentando sintomatologia parecidas como: repetição de cio, aborto, infertilidade e são capazes de induzirem a produção de mRNA para CXCL8 em células epiteliais. Porém cada microrganismo teve um perfil de expressão de mRNA para CXCL8 diferente em células epiteliais, com tempos de expressão diferentes e ativando receptores distintos. Com este trabalho observamos que o *C. fetus* subsp. *venerealis* induz uma expressão de mRNA para CXCL8 (Alves, 2010- Capítulo 2) mais precoce que *T. foetus*, que induz a expressão de mRNA para CXCL8 tardia em células epiteliais (Capítulo 3). Esta expressão mais tardia em *T. foetus* pode representar uma vantagem para o parasita durante a infecção, pois possibilita uma melhor colonização da mucosa do trato genital pelo parasita.

Foi observado que o *C. fetus* subsp. *venerealis* estimula a expressão de mRNA para CXCL8 principalmente pela via TLR2, o que para *T. foetus* ocorre pela via TLR4/MD-2. A expressão de mRNA para CXCL8 em *C. fetus* subsp. *venerealis* pode estar sendo estimulada por uma lipoproteína de

membrana externa que ativa TLR2. As lipoproteínas são muito importantes para a adesão do microrganismo ao epitélio do hospedeiro ajudando em uma melhor colonização, como foi observado por Rios (2005); Cottorello (2006) e Stynen (2009), em testes de aderência em células epiteliais *in vitro*. Estas lipoproteínas podem ser secretadas pela bactéria no decorrer da infecção e serem apresentadas em sua superfície. Já na infecção por *T. foetus* a expressão de mRNA para CXCL8 via TLR4/MD-2 pode estar sendo estimulada devido a grande quantidade de LPG encontrado na sua superfície, que pode também ser secretado pelo parasito. Este glicoconjugado está relacionado com aderência do microrganismo nas células epiteliais. O LPG esta sendo usado para testes de vacinas no controle da tricomonose genital bovina (Corbeil *et al.*, 2005), mas em grandes quantidades pode ser tóxico. E o flagelo do parasito pode estar ativando TLR5 na expressão de mRNA para CXCL8 em células epiteliais. Não é muito claro como essa ativação ocorre, pois a estrutura do flagelo do protozoário é bem diferente da estrutura do flagelo da bactéria.

Essas diferenças encontradas na resposta imune inata podem determinar diferenças no mecanismo que leva a morte embrionária nas duas infecções, que, porém tem sinais clínicos muito semelhantes. Desta forma sugerimos que, na patogenia da campilobacteriose genital bovina e da tricomonose genital bovina, as células epiteliais têm um papel importante na resposta imune inicial contra o *C. fetus* subsp. *venerealis* e *T. foetus*, na expressão de mRNA para CXCL8 que irão atrair as células de defesa para o local da infecção e iniciar a resposta ao patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T.M. Participação dos receptores semelhantes ao *Toll* na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção *in vitro* de células epiteliais por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Tritrichomonas foetus*. 2010. 61f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da UFMG de Belo Horizonte.
- CORBEIL, L.B.; DUNCAN, J.R.; SCHURING, G.G.D. *et al.* Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 1084–1090, 1974a.
- CORBEIL, L.B.; SCHURING, G.G.D.; DUNCAN, J.R. *et al.* Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter (Vibrio) fetus* antibodies in serum and cervico – vaginal mucus. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 422–429, 1974b.
- CORBEIL, L.B.; CAMPERO, C.M.; RHYAN, J.C. *et al.* Uterine Mast Cells and Immunoglobulin-E Antibody Responses During Clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Pathol.*, v. 42, p. 282-290, 2005.
- COTTORIELLO, A.C.P. *Relação parasita – hospedeiro na infecção de células epiteliais in vitro por Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. 2006. 76f Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GAULT, R.A.; KVASNICKA, W.G.; HANKS, D. *et al.* Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculate with a vaccine containing *Tritrichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 56, p. 454-459, 1995.
- PELLEGRIN, A.O.; LEITE, R.C. *Atualização sobre tricomonose genital bovina*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 22p (Documentos n. 54).
- RIOS, P.A.G.M. Aderência e invasibilidade em células HeLa de amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de animais. 2005. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- STYNEN, A.P.R. *Detecção de Campylobacter fetus em lavados prepuciais de touros pela PCR*. 2000. 39p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- VAN AERT, A., DEKEYSER, P., FLORENT, A.F., *et al.* Nature of *Campylobacter fetus* agglutinins in vaginal mucus from experimental infected heifers. *Br. Vet. J.*, v. 133, p. 88–94, 1977.