

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise metagenômica da comunidade bacteriana de vacas com distúrbios reprodutivos

Joana Maria Kastle Silva

Dr. Sávio Torres de Farias
Orientador

João Pessoa - 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise metagenômica da comunidade bacteriana de vacas com distúrbios reprodutivos

Joana Maria Kastle Silva

Dr. Sávio Torres de Farias
Orientador

Trabalho - Monografia apresentada
ao Curso de Ciências Biológicas
(Trabalho Acadêmico de conclusão
de Curso), como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

João Pessoa – 2015

Catálogo na publicação

Universidade Federal da Paraíba

Biblioteca Setorial do CCEN

Josélia M. O. Silva – CRB15 nº113

S586a Silva, Joana Maria Kastle.
Análise metagenômica da comunidade bacteriana de vacas com distúrbios reprodutivos / Joana Maria Kastle Silva. - João Pessoa, 2015. 32p. : il.

Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Sávio Torres de Farias.

1. Análise metagenômica. 2. Distúrbios reprodutivos - Gado.
3. Micoplasmose. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU: 576(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Joana Maria Kastle Silva

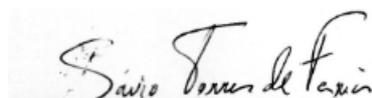
Análise metagenômica da comunidade bacteriana de vacas com distúrbios reprodutivos

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel (Licenciado) em Ciências Biológicas

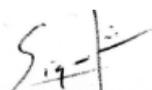
Data: 10/12/2015

Resultado: 9.7

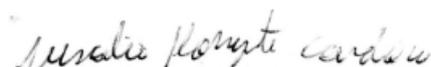
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Sávio Torres de Farias (DBM/UFPB)



Dr. José Pinto de Siqueira Júnior (DBM/UFPB)



Dr. Juscelio Donizete Cardoso (DBM/UFPB)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente aos meus pais, Alexandre e Beate, por serem meus pilares desde sempre e para sempre. A minha mãe especialmente por me ensinar a não desistir e me manter seguindo em frente quando não sabia bem o que fazer, apenas por estar do lado me apoiando. Ao meu pai por ser o melhor exemplo acadêmico e paternal que se podia querer, a minha inspiração científica e curiosidade natural quase sem limites é em grande parte culpa dele. Aos meus irmãos mais novos, David e Milena, por fazerem o que irmãos mais novos fazem de melhor: encher a paciência até alguém explodir. Também, por serem na maior parte do tempo toleráveis e por me amarem e apoiarem, obrigada. Aos nossos cachorros, sem os quais a família não estaria completa: Flor e Finn. Mas também a Fips, Flecky e Fifi, nossos saudosos caninos que alegraram a minha vida por tantos anos e me deixaram um buraco no peito.

Tenho que agradecer a Sávio por não apenas fazer o trabalho de orientador, mas também ter o efeito de me fazer deixar toda reunião acreditando que a ciência poderia, sim, ser algo para mim e me manter sempre motivada.

A Nureyev, cujo trabalho de mestrado foi a porta de entrada para este projeto e pela paciência de me ensinar.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto e as pessoas que colaboraram com este trabalho na Universidade Federal da Bahia, Dr. Lucas Marques, e na Universidade de São Paulo, Dr. Jorge Timenetsky.

Aos meus amigos Gabi, Ketyucia, Rayssa, Louise, Wilka, João Lucas e Lucas. Obrigada por ficarem por perto, pelas risadas, por tudo.

Quero agradecer aos amigos da universidade, especialmente: Ludmila, Luana, Daniel, Leo, Andressa e Paula, além de tantos outros. Como também a Talita e Lucas e todo o pessoal das mesas de RPG, que garantiram que ao menos um dia da semana fosse recheado de aventuras fantásticas.

A Moema, que conto entre minhas pessoas favoritas há pouco mais de quinze anos.

RESUMO

Sendo animais economicamente explorados, patologias que afetam o gado tem uma consequência direta sobre a produção, levando a uma diminuição dos lucros. Micoplasmoses são fontes de diversos distúrbios reprodutivos que atingem o gado, como agalactia contagiosa, mastite, endometrite, placentite, aborto, infertilidade e vulvovaginite granular. O tratamento destas patologias pode ser muito desafiadora, impulsionando este estudo a compreender a dinâmica das comunidades bacterianas envolvidas na instalação da infecção e no desenvolvimento dos sintomas. Com este fim, amostras do trato genital de vacas saudáveis e vacas com sintomas de micoplasmose foram coletadas usando swabs. O material genético foi purificado e extraído dessas amostras e, após a amplificação do gene 16s, o seqüenciamento foi realizado pela plataforma de seqüenciamento Ion Torrent Personal Genome Machine - PGM, usando reagentes do kit 200 (Life Technologies). Os resultados do seqüenciamento foram submetidos a programas de bioinformática para desenvolvimento e análise dos perfis microbianos comparativos. Os resultados mostram que em vacas saudáveis as bactérias colonizando o trato genital são em sua totalidade associadas ao hospedeiro e não patogênicas. A maioria era anaeróbia, apresentando um pH neutro como ótimo para crescimento bacteriano. Os dados da diversidade bacteriana do perfil com distúrbios reprodutivos sugerem uma mudança significativa no ambiente. Neste estado, bactérias anaeróbias, aeróbias e com requerimento de oxigênio facultativo estão presentes. O pH do trato genital de vacas doentes é mais ácido e a presença de oxigênio é um fator importante, indicando uma mudança ecológica na comunidade bacteriana. A quantidade total e a diversidade de gêneros bacterianos é maior nos indivíduos que apresentam os sintomas. Isto novamente sugere uma mudança ambiental, permitindo a colonização dos nichos presentes no trato genital por novas bactérias. A relação entre bactérias patogênicas aeróbias e anaeróbias nos indivíduos doentes pode representar um caso de sinergia bacteriana, em que diferentes bactérias trabalham em conjunto no desenvolvimento da infecção, uma condição observada em diversos modelos animais. Enterobacteriaceae e Bacteroides são os grupos mais numerosos presentes em ambos os estados. Enterobacteriaceae é conhecido por diminuir o pH local, inibindo a função dos neutrófilos através da produção de succinato, enquanto Bacteroides dificulta a fagocitose através da competição com opsoninas. Isto diminui a opsonização de bactérias patogênicas, prejudicando a resposta imunológica a infecção. No perfil com distúrbios reprodutivos novas famílias emergem, como Pasteurellaceae, cujas espécie *Histophilus somni* é um conhecido patógeno oportunista de gato causando doenças nos sistemas respiratório, genital, nervoso e circulatório. *Arcanobacterium pyogenes*, outra espécie patogênica com relações ecológicas bem estudadas, Prevotella, Fusobacterium e Mycoplasma também estão presentes, agravando a infecção. Nossos dados sugerem que os sintomas não são resultantes da ação de um único patógeno e sim um reflexo de uma mudança ambiental favorável a colonização por diferentes bactérias patogênicas que trabalham em conjunto para causar a doença.

Palavras-chave: micoplasmose, distúrbios reprodutivos, gado, análise metagenômica.

ABSTRACT

Pathologies in cattle have a direct impact on production, leading to a profit decrease. Mycoplasmosis causes a range of reproductive disorders, such as contagious agalactia, mastitis, endometritis, placentitis, abortion, infertility and granular vulvovaginitis. The treatment of these pathologies can be specially challenging, driving this study to comprehend the dynamic of the bacterial communities involved in the instauration of the infection and symptoms development. To do so, samples of the genital tract from healthy cows and cows with symptoms of mycoplasmosis were collected using swabs. The genetic material was purified and extracted from these samples and, following amplification of the 16S RNA gene, sequencing of amplicon libraries was performed by the Ion Torrent Personal Genome Machine - PGM sequencing platform, using Sequencing kit 200 (Life Technologies) reagents. The sequencing results were submitted to bioinformatics programs for the development and analysis of the comparative microbial profiles. Our results show that in healthy cows the bacteria colonizing the genital tract were in totality host associated and non-pathogenic. The majority were anaerobic with a neutral pH optimal for bacterial growth. The data for the bacterial diversity in the profile with reproductive disorders suggests a significant change in the environment. In this state, anaerobic, facultative and aerobic genera are present. The pH of the genital tract of cows affected by the reproductive disorders is more acid and the presence of oxygen is an important factor, indicating an interesting shift in the ecology of the bacterial community. The total quantity and diversity of bacterial genera are higher in the affected individuals. This suggests an environmental change taking place, permitting new bacteria to colonize the genital tract niches. The relationship between anaerobic and aerobic pathogenic bacteria in the affected animals may be a case of bacterial synergy, in which different bacteria work together in the development of the infection, a condition observed in distinct animal models. Enterobacteriaceae and Bacteroides are the most numerous groups present in both the healthy and the affected states. Enterobacteriaceae are known for decreasing local pH, inhibiting neutrophil functions via succinate production, while Bacteroides difficult phagocytosis through competition with opsonins. This reduces bacteria opsonisation, hindering the immune response to infection. In the profile with reproductive disorders new families emerge, such as Pasteurellaceae, which species *Histophilus somni* is a known opportunistic cattle pathogen causing diseases in the respiratory, genital, nervous and circulatory systems. *Arcanobacterium pyogenes*, another pathogenic species with well studied ecologic relationships, Prevotella, Fusobacterium and Mycoplasma are also present, aggravating the infection. Our data suggests that the symptoms are not a result of a single pathogen, but rather a reflection of an environmental change favourable to colonization by different pathogenic bacteria that work together to cause disease.

Keywords: mycoplasmosis, cattle, reproductive disorders, metagenomic analysis.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A MICROBIOLOGIA	1
1.2 MICROBIOLOGIA E FILOGENIA	2
1.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS BACTÉRIAS	4
1.4 METAGENÔMICA COMO FERRAMENTA EM ASCENSÃO E SEUS USOS DIVERSOS	5
1.5 METAGENÔMICA E SAÚDE ANIMAL	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS	10
3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL	10
3.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RDNA	11
3.4 GERAÇÃO DOS PRIMERS 16S E DA BIBLIOTECA DE AMPLIFICAÇÕES	11
3.5 PCR EM EMULSÃO E SEQUENCIAMENTO	11
3.6 ANÁLISE DAS SEQUENCIAS	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
6. REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A MICROBIOLOGIA

A origem da microbiologia pode ser traçada a partir do século XII, quando já se atribuía o desenvolvimento de algumas doenças à ação de "seres invisíveis". O desenvolvimento dos primeiros microscópios foi um marco importante para a história da microbiologia, uma vez que a observação dos pequenos organismos tornou-se possível. Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) era um comerciante holandês muito hábil na construção de lentes e que em 1670 enviou as suas observações para a Royal Society de Londres. Van Leeuwenhoek chamou os seres que observava pelas lentes que desenvolvia de "animálculos".

Ainda no século XVII, coube a Louis Pasteur (1822-1895) através de uma série de experimentos provar que a teoria da geração espontânea que se mantinha uma forte influência sobre os cientistas da época estava errada. Depois de comprovar que a vida só pode se originar a partir de outros organismos, Pasteur deixou seu marco na microbiologia pelo seu trabalho em diferentes campos de estudo. Foi o primeiro a determinar que a fermentação era resultante da ação de microorganismos, sendo as suas conclusões sobre o estudo de deterioração de alimentos a chave para o desenvolvimento de métodos como a pasteurização (desenvolvida por ele próprio) e medidas anti-sépticas em diferentes áreas, como a medicina e a indústria alimentícia.

O cientista alemão Robert Koch (1843-1910) é outra figura importante para a história da microbiologia. Ele foi um dos primeiros a isolar bactérias como a causadora do carbúnculo, doença caracterizada por uma infecção que pode afetar diferentes órgãos. Foram os discípulos de Koch e Pasteur, entre outros grandes cientistas, que firmaram as bases da microbiologia entre 1880 e 1990. Com trabalho árduo e experimentações, foram capazes de fazer a ligação entre diversas doenças e seus respectivos agentes etiológicos. Trabalharam ainda na elaboração de uma série de procedimentos e técnicas que permitiram o isolamento, crescimento e identificação de diferentes bactérias. Isto permitiu um primeiro acesso a diversidade e às diferentes habilidades que estes microorganismos possuem. O próprio Koch descobriu o bacilo da tuberculose em 1882 e, um ano depois, a bactéria causadora da cólera asiática. Em 1883 o microrganismo causador da difteria também foi descoberto. A essa descoberta seguiu-se a constatação feita por Pasteur e colegas de que animais injetados com uma versão de

antraz cultivada em laboratório se mostravam imunes a doença. Deu-se início, então, ao campo de estudos voltado para o desenvolvimento de imunidade que mais tarde levaria a produção das primeiras vacinas e soros.

Dentro deste cenário, a microbiologia que conhecemos hoje não envolve apenas o estudo de bactérias, mas também o de vírus e organismos similares. Charles Chamberland (1851-1902), um assistente de Pasteur, observou que bactérias eram retidas por filtros de porcelana, enquanto outros seres microscópicos eram filtráveis e conseguiam atravessar a barreira. Em 1892 o russo Dimitri Ivanovski (1864-1920) estudava a doença do tabaco e descobriu em seus experimentos que o agente causador do distúrbio era um organismo filtrável. Com o passar dos anos, cada vez mais agentes filtráveis eram apontados como causadores de doenças conhecidas, como a febre aftosa do gado. Estes seres foram denominados vírus. Com os avanços em suas técnicas e procedimentos, a microbiologia teve sua ascensão na década de 1940, sendo descobertos diversos agentes etiológicos de doenças e, com esse conhecimento em mãos, medidas de controle foram desenvolvidas.

Tradicionalmente nosso conhecimento sobre populações bacterianas se restringia aos grupos que podem ser cultivados em laboratório, como praticado pelos cientistas quando a microbiologia dava seus primeiros passos. Este método clássico envolve a preparação de meios de cultivo sólidos ou líquidos com disponibilização de fontes de carbono, energia e aceptores de elétrons de acordo com os requerimentos metabólicos das espécies bacterianas alvo. Este tipo de abordagem enfrenta um empecilho, especialmente quando relacionada a estudos de diversidade e ecologia. Estudos sugerem que menos de 1% das espécies bacterianas são cultiváveis (Staley e Konopka, 1985), o que demonstra a gigantesca parcela de diversidade que não pode ser acessada pelo método clássico que exclui organismos que possuem requerimentos difíceis de serem sanados em laboratório e/ou envolvidos em relações simbióticas complexas impossíveis de serem recriadas *in vitro*.

1.2 MICROBIOLOGIA E FILOGENIA

Woese (1985) trata a bacteriologia como uma ciência centrada em um organismo e no estudo dos agrupamentos naturais que as bactérias formaram ao longo de seu tempo evolutivo, como acontece na botânica e na zoologia. Sendo assim, ele sugere que a bacteriologia tem como suas bases quatro principais componentes (1987): os estudos

da estrutura/função, da diversidade, da ecologia e da evolução das bactérias. Porém, diferentemente da botânica ou zoologia, a bacteriologia não seria capaz de estudar seus organismos foco sem informações sobre a caracterização molecular desses seres. Parte desta dificuldade se deve ao fato de bactérias possuírem uma grande plasticidade de formas, sendo características do metabolismo mais relevantes para a separação dos grupos do que as informações fenotípicas, por exemplo.

Sendo a evolução das bactérias (a origem do grupo e como seus componentes estão ancestralmente interligados) o componente que permite uma compreensão biológica do grupo, foram necessários décadas de pesquisa e trabalhos para o desenvolvimento do conceito biológico que melhor as descreve. Woese (2000) argumenta que sem as informações sobre a filogenia de um grupo biológico, estudos de sua ecologia e diversidade ficam comprometidos.

Depois de décadas de debates e hipóteses, determinou-se que a árvore universal mostra os procariotos divididos em dois grandes grupos de organismos: Archaea e Bacteria. Os dois grupos possuem diferenças em seu metabolismo, nas características de suas paredes celulares e membranas, no processo de tradução e transcrição e na replicação de seus genomas. Woese aborda estas diferenças no artigo de 1990 destacando as diferenças mais significantes entre Archaea e Bacteria. Uma das diferenças mais evidentes está no metabolismo desses dois tipos. Quando nos referimos a diversidade de metabolismos, Bacteria é o grupo mais variado da Terra (Woese, 1985), sendo seus componentes altamente versáteis na conquista dos mais variados ambientes. Esse poder metabólico e a versatilidade das Bacteria é único em nosso planeta, levantando questões sobre como um repertório tão diverso pode ter sido adquirido por estes seres vivos. Mesmo sendo metabolicamente menos diverso, Archaea recebe muita atenção dos estudiosos, especialmente pela habilidade de alguns de seus grupos (Euryarchaeota) de realizar metanogênese, o que até agora mostrou-se uma capacidade ímpar entre microrganismos. As Archaea também apresentam um padrão celular único (Graham et al. 2000), o que as afasta de Bacteria e dos eucariotos.

Com os estudos filogenéticos desses grupos se aprofundando e possibilitando descobertas reveladoras, chegamos um pouco mais perto da definição do que são bactérias. A evolução e as relações ecológicas desses grupos finalmente estão sendo acessadas e com a ajuda do desenvolvimento de técnicas e procedimentos cada vez mais

eficientes, as pesquisas estão no auge em diferentes áreas da bacteriologia. Geomicrobiologia, ecologia microbiana marinha e microbiologia genômica são áreas novas que acessam a importância das bactérias em processos geológicos, no comportamento dos oceanos e removem barreiras em estudos ecológicos e questões diversas sobre evolução bacteriana ao longo dos milênios. Estas áreas pioneiras estão revolucionando a maneira como encaramos o ecossistema global, mais dependente destes microrganismos que poderia ser imaginado por Pasteur e Koch no início da microbiologia.

1.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS BACTÉRIAS

Bactérias estão por toda parte. Desde ambientes inóspitos como a base de um vulcão, desertos salinos e fontes termais ricas em ácido sulfúrico, hostis a qualquer outra forma de vida, até planetas distantes tão alienígenas a nós quanto o fundo dos nossos oceanos onde bactérias também se proliferam em grande quantidade (Azam, 1998). Também estão presentes no corpo humano numa quantidade que suplanta as nossas próprias células em 10:1 (American Society for Microbiology, 2008), estando envolvidas em nossa saúde e doença de uma forma mais intrigada e curiosa que sonhado pelos cientistas quando foram observadas através dos primeiros microscópios.

Bactérias são parte dos mais diversos ciclos vitais do planeta e em menor escala evoluíram em conjunto conosco, sendo descobertas cada vez mais formas pelas quais são essenciais a nossa sobrevivência. Trataremos primeiro do papel que estes seres assumiram nos ciclos que regem as comunidades de seres vivos.

Bactérias participam de importantes ciclos para a manutenção da vida no nosso planeta. Ecossistemas marinhos e terrestres dependem da ação de diferentes bactérias para a ciclagem de nutrientes como carbono, nitrogênio e enxofre (Lengeler et al, 1999). Várias espécies de bactérias participam do processo de decomposição da matéria orgânica, quebrando compostos complexos em substâncias menores, que por sua vez ficam disponíveis para toda a comunidade. Este processo é importante para a ciclagem de nutrientes dentro do ecossistema global e o papel realizado pelas bactérias decompositoras nele é de extrema importância uma vez que a maioria dos seres vivos não consegue assimilar o carbono orgânico presente nos tecidos em decomposição de forma direta.

O nitrogênio é um nutriente que está presente no solo e é essencial para o desenvolvimento saudável de plantas. Bactérias presentes no solo promovem a fixação do nitrogênio, convertendo o nitrogênio gasoso em nitratos ou nitritos através de seus processos metabólicos, liberando no ambiente os produtos resultantes que ficam disponíveis para diversas espécies. Algumas plantas ao longo de sua evolução desenvolveram uma relação simbiótica (vantajosa para os dois lados envolvidos) com estas bactérias, modificando a estrutura de suas raízes para abrigar os microrganismos em seu interior. O exemplo mais usado para ilustrar esta relação é o de espécies de leguminosas com bactérias *Rhizobium*. Enquanto a planta recebe nitrogênio importante para o seu crescimento as bactérias são protegidas e recebem da planta nutrientes para o seu próprio desenvolvimento.

Para entender melhor a importância das bactérias na manutenção dos ecossistemas, tornou-se necessário o acesso a uma maior diversidade deste grupo nos ambientes mais distintos. Compreender o papel destes microrganismos na manutenção dos processos ecológicos ficou mais rápido, barato e completo através do desenvolvimento de uma nova abordagem: a metagenômica.

1.4 METAGENÔMICA COMO FERRAMENTA EM ASCENSÃO E SEUS USOS DIVERSOS

A identificação de bactérias já não está restrita ao desenvolvimento de culturas em laboratório (Pace et al, 1985). Graças a uma molécula chamada rRNA, cientistas são capazes de identificar e determinar o parentesco de bactérias sem ter que esperar o crescimento das culturas e enfrentar os obstáculos restritivos da cultura em laboratório. Os genes 16s da subunidade ribossomal menor (rRNA) estão presentes em todos os procariotos, sofrem pressão seletiva semelhante e contém regiões espécies-específicas variáveis, o que permite inferir relações filogenéticas (Hugenholtz e Pace, 1996). Baseado nisto, primers de PCR universais que se anelam a porções altamente conservadas que flanqueiam as regiões variáveis do gene podem ser usados para permitir a amplificação da maioria das bactérias conhecidas, ajudando a compreender uma grande variedade de ambientes e suas comunidades bacterianas associadas. Como o rRNA pode virtualmente ser extraído de qualquer amostra ambiental, a genética bacteriana encontrou um atalho atraente para a classificação, identificação e detecção desses organismos (Woese, 2000). Pioneiro nesta abordagem, Norman Pace e

colaboradores (1985) publicaram diversos experimentos refinando essa nova visão, desenvolvendo seus princípios e realizando demonstrações práticas de como uma abordagem baseada em seqüências moleculares poderia revolucionar o campo de ecologia microbiana (Xu, 2006).

O termo metagenômica foi usado pela primeira vez no fim do XX , conforme mencionado por Handelsman et al (2004) e corresponde hoje a uma das mais promissoras áreas da biologia, não se restringindo a estudos filogenéticos e de ecologia. A metagenômica envolve o estudo de seqüências de DNA obtidas diretamente do ambiente e também vem sendo usada para denominar todo tipo de análise realizada a partir de uma amostra de DNA ambiental, como todos seus procedimentos e metodologia envolvidos até alcançar o resultado final. Essa abordagem permite ir além da estrutura de comunidade (apontando riqueza de espécies e distribuição) e possibilita também determinar o potencial funcional (metabólico) desses seres vivos (Tyson, 2004). Esta última característica vem firmando a metagenômica como ferramenta importante em estudos biotecnológicos, em especial aqueles envolvendo a análise de enzimas com potencial econômico.

Uma diversidade considerável de ambientes teve seus genomas ambientais seqüenciados, como solos, oceanos e o trato intestinal humano (Goll et al, 2010). O Projeto Microbioma Humano (Peterson et al, 2009) foi lançado em 2009 e trouxe a metagenômica para a área da saúde. A iniciativa pretende mapear as comunidades associadas ao intestino, à boca, à pele e à vagina humana. Ainda na área médica, estudos metagenômicos têm revelado relações entre comunidades bacterianas comensais e alguns tipos de câncer (Tlaskalova´-Hogenova´et al, 2011). E a utilização da metagenômica na área médica continua em forte ascensão.

Trabalhos realizados com amostras de placentas, por exemplo, mostraram que ela apresenta uma diversidade microbiana única, composta principalmente por bactérias não-patogênicas e comensais, possuindo provavelmente um papel importante na manutenção da saúde do feto ao longo da gestação (Aagaard et al, 2014). De forma semelhante, Belkaid e Segre (2014) usaram a metagenômica para tecer um paralelo entre a microbiota da pele humana e o sistema imune, discutindo sobre como bactérias e células da pele trabalham em conjunto para manter a barreira física e química da pele funcional ao longo de invasões por organismos patogênicos e traumas físicos.

O melhoramento de metodologias de isolamento de DNA, estratégias de clonagem, e técnicas de seqüenciamento permitiu o acesso e a exploração de comunidades bacterianas de ambientes extremos e inóspitos, como gêiseres ricos em elementos sulfatados, lagos hipersalinos e geleiras (Simon e Daniel, 2009). A metagenômica também é usada para obtenção de novos biocatalizadores naturais (Streit e Schmitz 2004), descobrindo que as características das enzimas mudam de acordo com o habitat das bactérias e contribuindo para a área de enzimologia. O acesso a biomoléculas através da metagenômica têm movimentado a biotecnologia e estudos sobre mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos podem ajudar na descoberta de novas drogas (Cottrell et al, 1999, Wang et al, 2006). A abordagem metagenômica também foi empregada em estudos arqueológicos e ajudou a analisar espécies extintas como o mamute (Poinar et al, 2006) e os Neandertais (Noonan et al, 2006).

1.5 METAGENÔMICA E SAÚDE ANIMAL

A criação de gado é uma atividade econômica amplamente distribuída e alguns estudos metagenômicos foram realizados para compreender a microbiota natural destes animais e sua alteração em estados de patogenia, assim como o potencial biotecnológico associado a sua microbiota. Estudos envolvendo amostras do rúmen de vacas sugeriram novos genes bacterianos que estão envolvidos na quebra da celulose e podem auxiliar na utilização biotecnológica com fins de desenvolvimento industrial de biocombustíveis (Knight et al, 2012). Também já são conhecidas comunidades bacterianas presentes nas fezes destes animais (Shanks et al, 2006) e a diversidade de bactérias que estão associadas ao útero sadio e com mastite pós-parto (Santos et al, 2010), ambos realizados utilizando-se a abordagem metagenômica.

O Brasil é detentor do segundo maior rebanho bovino do mundo, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2010). Além disso, é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina mundial, o que mostra a importância deste setor para a economia do país.

Sendo animais economicamente explorados, patologias que afetam o gado tem uma consequência direta sobre a produção, levando a uma diminuição dos lucros. Micoplasmoses são fontes de diversos distúrbios reprodutivos que atingem o rebanho. Seus sintomas incluem: agalactia contagiosa, mastite, endometrite, salpingite,

placentite, vulvovaginite granular, aborto, repetições de cio e infertilidade, causando dessa forma um prejuízo à produção (Doig, 1981). O tratamento para estes distúrbios reprodutivos pode se mostrar bastante complexo, uma vez que a administração de antibióticos pode não ser efetiva para a eliminação do quadro patológico (Currin, 2009).

As bactérias do gênero *Mycoplasma* (pertencente a classe Mollicutes), são consideradas os menores seres vivos de vida livre do planeta (Waites e Talkington 2004). Os integrantes deste gênero não apresentam parede celular, o que os diferencia dos demais procariontes. A ausência de parede celular é importante para os fatores patogênicos do grupo, uma vez que antibióticos que afetam a sua síntese (como penicilina e beta-lactam) tornam-se inefetivos. Mycoplasmas habitam principalmente as superfícies mucosas do trato respiratório e genital, invadindo a submucosa em casos de imunossupressão e se espalhando pelo hospedeiro através dos vasos sanguíneos.

Uma infecção por *Mycoplasma*, em especial *Mycoplasma bovis*, um patógeno comum de rebanhos de gado ao redor do planeta, pode apresentar sintomas que estão ligados a inflamação de diversos órgãos. A inflamação pode ocorrer nas articulações, causando artrite, nas tetas, acarretando o desenvolvimento de mastite e nos sistemas respiratório e genital. Quando ocorre no sistema respiratório *M. bovis* infecta os pulmões dos animais, podendo causar pneumonia que se torna fatal caso ocorra juntamente com outras infecções bacterianas, como as causadas pelos grupos *pasteuralle*, *streptococi* e *staphylococcus*. Infecções secundárias dificultam ainda mais o tratamento da Mycoplasmoses, tornando as bactérias resistentes ao tratamento com antibióticos (Pfützner e Sachse, 1996). Os mecanismos de patogenicidade de *M. bovis* são em sua maioria desconhecidos, mas sabe-se que a espécie apresenta uma grande capacidade de variar as famílias de proteínas que são expressadas na superfície de sua membrana, o que é um ponto importante para se entender a dinâmica patógeno-hospedeiro. A administração de antibióticos costuma ser inefetiva no tratamento de Mycoplasmoses bovinas (Caswell e Archambault, 2007) e uma vez que não existem vacinas para profilaxia da doença, identificá-la em estágios iniciais torna-se essencial.

Quando falamos da infecção por *Mycoplasma bovis* no aparelho genital de vacas é importante levar em consideração que assim como nos casos em que há desenvolvimento de pneumonia, não costuma haver diferenças na sintomatologia que distinguem Mycoplasmoses de doenças causadas por outros fatores. Isto significa que

inicialmente não há separação entre distúrbios reprodutivos causados por *Mycoplasma* e distúrbios reprodutivos decorrentes de qualquer outro agente etiológico ou condição ambiental (Pfützner e Sachse, 1996). Sendo os sintomas não-específicos, para ser identificado como *Mycoplasma* é necessário que se faça uma coleta de material do animal que apresente os sintomas clínicos seguida de cultivo das bactérias da amostra em laboratório em meios especialmente montados para proporcionar o crescimento de *Mycoplasma*. Uma outra abordagem tradicional para a identificação de *M. bovis* envolve a observação de anticorpos contra a bactéria que podem estar presentes nas amostras coletadas.

Considerando as características da doença, o presente estudo analisa através de uma abordagem metagenômica a comunidade microbiana associada à mucosa vaginal de vacas no estado sadio e com sintomas de micoplasmose com o intuito de compreender a instalação da patogenia, como também caracterizar a diversidade microbiana apresentada em ambos os quadros.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um estudo no campo da microbiologia no sentido de possibilitar uma maior compreensão sobre a microbiota associada ao trato genital de vacas saudáveis e vacas com sintomas de micoplasmose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levantar dados sobre as mudanças na diversidade entre microbiotas características de um estado saudável e um estado doente usando-se uma abordagem metagenômica;

Analisar dados sobre características microbianas para inferir mudanças ocorridas no ambiente durante a transição para um estado afetado;

Apontar alguns grupos potencialmente patogênicos que estão ligados ao desenvolvimento dos sintomas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de DNA foram coletadas da região genital de bovinos em propriedades na região semi-árida do estado da Bahia, com apoio da UFPBA. A coleta foi feita atrás de fricção de swabs na região vulvovaginal/prepucial e realizada em cinco animais que apresentavam sinais clínicos de distúrbios reprodutivos acarretados pela micoplasmose e em cinco animais que não apresentavam este quadro. Os sintomas apresentados pelas vacas doentes foram: vagina esbranquiçada, fluído vulvar purulento, inflamação da mucosa vulvar e vulvovaginite granular. Os swabs foram obtidos em duplicata e armazenados sob refrigeração em meios de transporte até serem usados novamente. Também foram aplicados questionários nas propriedades onde as coletas foram realizadas sobre as condições ambientais e sintomas que os animais apresentavam.

3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL

O protocolo de purificação utilizado descreve o isolamento do DNA genômico com base na lise direta dos microorganismos a partir de amostras de swab realizada na UFPB (Henne et al., 1999): 1,35 mL tampão de extração de DNA (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM sódio-EDTA, 100 mM fosfato de sódio, 1,5 M NaCl, 1% brometo de cetil trimetilamônio (CTAB)), suplementado com 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 200 µL de lisozima (50 mg/mL) foram adicionados à amostra seguido por uma incubação a 37°C por 30 min, agitação opcional (150 rpm); 1,5 µL (17.000 U) RNase A foram adicionados seguido de incubação ainda a 37°C por 30 min; 150 µL SDS 20% foram adicionados seguido por uma incubação por 2 h a 65°C e centrifugação posterior a $4.500 \times g$ por 10 min; extração do sobrenadante com clorofórmio, seguido pela precipitação dos ácidos nucleicos com isopropanol (0,7 vol) por 1 h em temperatura ambiente e centrifugação subsequente por 45 min a $16.000 \times g$ e 4°C. O precipitado de DNA é lavado com etanol 70%, seco, e dissolvido em 25 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose corado com brometo de etídio e seu tamanho estimado por comparação com um marcador específico. O DNA total extraído das amostras foi purificado através de protocolo específico.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA

O DNA total foi utilizado para a amplificação do gene ribossomal 16S rDNA através da técnica de PCR. Foram usados os primers universais 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), específicos para o domínio Bacteria (Lane *et al.*, 1991). O PCR foi realizado em termociclador com os seguintes parâmetros: 1 minuto a 80°C e 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguido por 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C por dois minutos e 72°C por 2 minutos, os dois últimos ciclos foram de 72°C durante 10 minutos para extensão final e 4°C por 15 minutos. Cada 48 µL de reação de PCR continha 40 µL de PCR SuperMix, 5 µL de DNA total e 1,5 µL de cada primer utilizado. A quantidade de cada reagente foi determinada seguindo os protocolos do fabricante da mistura para amplificação PCR SuperMix. As amostras amplificadas foram quantificadas usando-se NanoDrop. As amostras quantificadas foram então enviadas para sequenciamento.

3.4 GERAÇÃO DOS PRIMERS 16S E DA BIBLIOTECA DE AMPLIFICAÇÕES

A amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) da região hipervariável V5-V6 do 16S rRNA foi feita usando primers degenerados para frente V5F-784: 5'-AAC RGG ATT AGA TAC CC-3') e reverso (V6R-1064: 5'-CGA CRR CCA TGC ANC ACC T-3') específicos para bactérias. O terminal 5' dos primers de frente foram unidos ao adaptador-A seguido da seqüência chave, os primers reversos foram fusionados com uma seqüência truncada do adaptador-Pi (TRP1). Os primers foram diluídos em água molecular em quantidades iguais. Para preparação da biblioteca de amplificados foram combinados 4 ng de DNA metagenômico de cada amostra, 1 U platina Taq DNA polimerase de alta fidelidade, 5mM dNTPs, 2mM MgCl₂ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 10 pmol de primers pré-misturados em um volume total de 25ml de mistura de reação. As condições de amplificação do PCR foram 94°C por 3min, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 15s e 68°C por 10s, com uma fase final de alongação a 68°C por 30s. Os produtos da PCR foram purificados em gel de agarose 1.5%.

3.5 PCR EM EMULSÃO E SEQUENCIAMENTO

PCR em emulsão foi realizada usando o Express Ion Template Kit V2.0 (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante nos laboratórios da USP. O seqüenciamento da biblioteca de amplificadas foi feita usando a plataforma de seqüenciamento Ion Torrent Personal Genome Machine - PGM, usando os reagentes do Sequencing kit 200 (Life Technologies), também seguindo o protocolo do fabricante (Part No. 4471999 Rev. B, 13. Oct. 2011) com as seguintes modificações: 1) o chip foi lavado uma vez adicional com isopropanol e depois do buffer de anelamento, checado e calibrado para remover possíveis bolhas de ar resultantes desses procedimentos; 2) os beads foram carregados duas vezes no chip 314, com cada carregamento seguido de quatro ciclos de centrifugação a velocidade máxima por 15s (Mini Star, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) e agitação a 3000rpm por 10s em um IKA orbital shaker (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) equipado com um adaptador especial para o chip, seguido por centrifugação no fim de cada carregamento por 15s e 3) a amostra inteira foi carregada no chip.

3.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As pouco mais de 400 mil seqüências brutas tiveram suas qualidades checadas através da utilização do programa Mothur (Schloss et al 2009). Reads com qualidade baixa foram removidas do restante das análises,. O algoritmo UCHIME presente no Mothur foi usado para a identificação de formações quiméricas artificiais. Unidades operacionais taxonômicas (OTUs) foram determinadas através de análises de agrupamento para cada amostra individualmente com base no Ribosomal Database Project (Cole et al 2009). Blastn local foi usado para determinar a taxonomia das seqüências dos genes 16S rRNA baseando-se no banco de dados 16SMicrobial. O blastn é uma ferramenta que compara as seqüências com informações no banco de dados, apontando grupos taxonômicos aos quais as bactérias da amostra provavelmente pertencem. Os resultados obtidos pelo blastn foram submetidos a um segundo programa, o MEGAN (MetaGenome ANalyzer), que usou os dados para geração de gráficos dos perfis taxonômicos comparativos e dos atributos microbianos das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas cerca de 62 mil reads após a remoção de dados com baixa qualidade. As curvas de rarefação obtidas através do Megan mostram uma cobertura satisfatória alcançada pelas OTU's utilizadas (Fig. 1, Fig. 2). As curvas referentes ao

controle possuem uma qualidade menor, mas ainda considerável, não se afastando muito do platô de cobertura ideal.

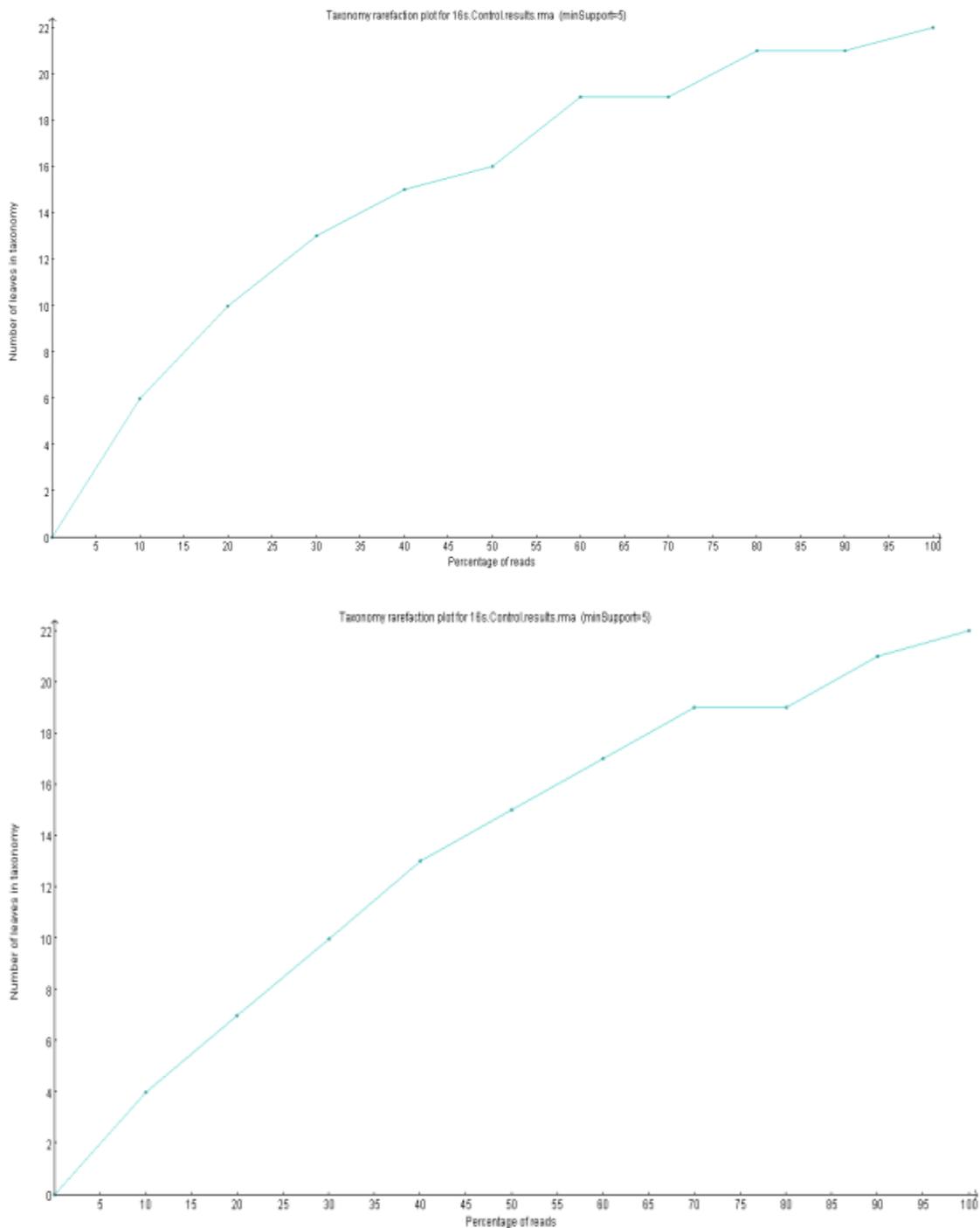


Figura 1- Curvas de rarefação obtidas do perfil saudável. As curvas se referem aos níveis taxonômicos de família e gênero, respectivamente.

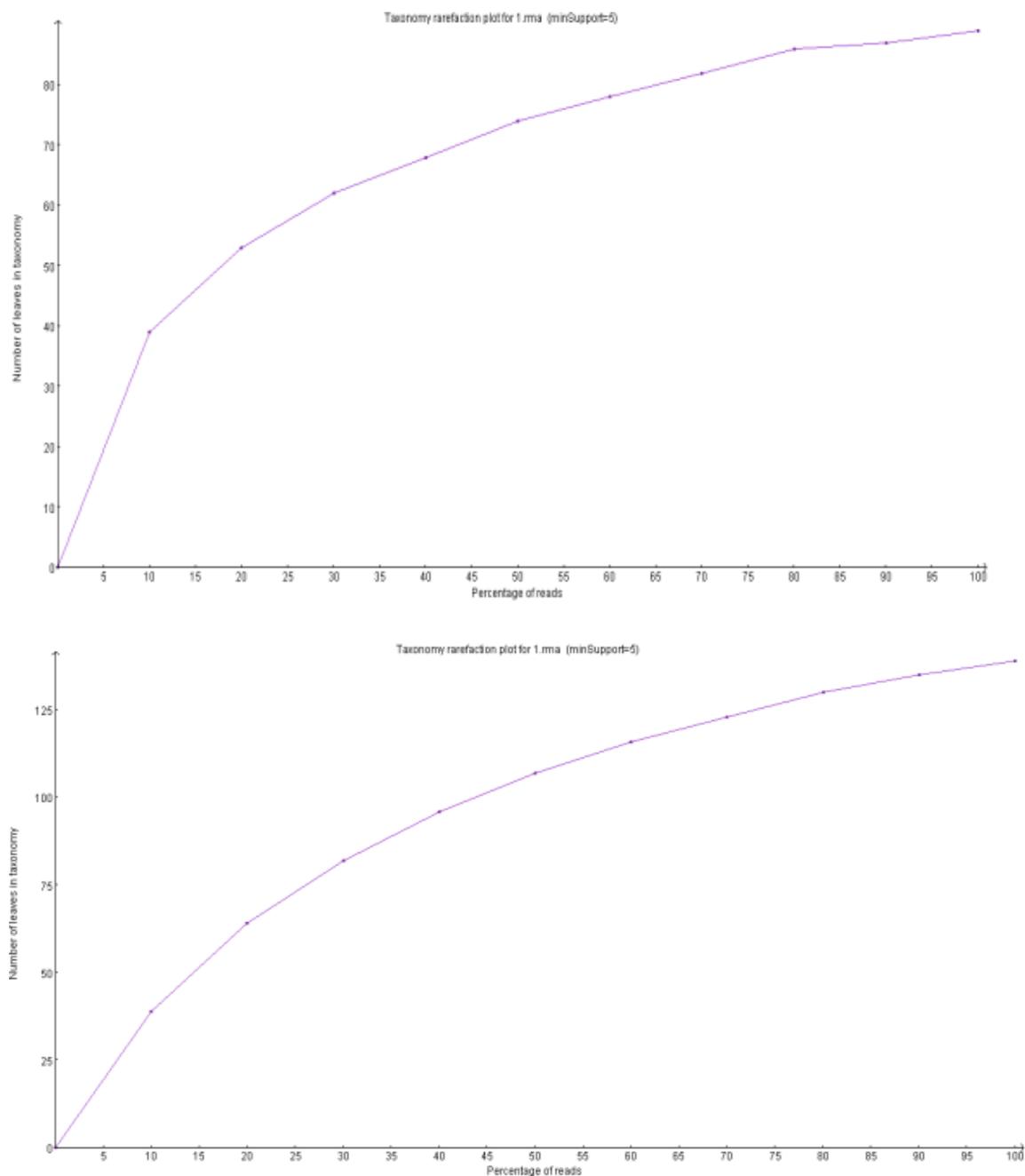


Figura 2 – Curvas de rarefação obtidas do perfil afetado por distúrbios reprodutivos. As curvas se referem aos níveis taxonômicos de família e espécie, respectivamente.

As classificações taxonômicas das OTU's mostram a diversidade ecológica presente em cada ambiente analisado. As leituras realizadas pelo Blastn indicam 22 grupos bacterianos caracterizando a comunidade presente em animais sadios: Actinomycetaceae (8 reads, 0,95%); Bacteroidaceae (237 reads, 28,31%); Betaproteobacteria (6 reads, 0,71%); Clostridiaceae (22 reads, 2,63%); Coriobacteriaceae (11 reads, 1,31%); Corynebacteriaceae (11 reads, 1,31%);

Cytophagaceae (44 reads, 5,25%); Deltaproteobacteria (5 reads, 0,59%); Enterobacteriaceae (208 reads, 24,85%); Mollicutes (5 reads, 0,59%); Moraxellaceae (5 reads, 0,59%); Oscillospiraceae (9 reads, 1,07%); Planctomycetaceae (13 reads, 1,55%); Porphyromonadaceae (37 reads, 4,42%); Prevotellaceae (6 reads, 9,71%); Rikenellaceae (67, 8%); Ruminococcaceae (25 reads, 2,98%); Selenomonadales (35 reads, 4,18%); Spirochaetaceae (18 reads, 2,15%); Streptococcaceae (31 reads, 3,70%); Verrucomicrobiaceae (7 reads, 0,83%) e Victivallaceae (21 reads, 2,50%) (Fig. 3 e Fig.4).

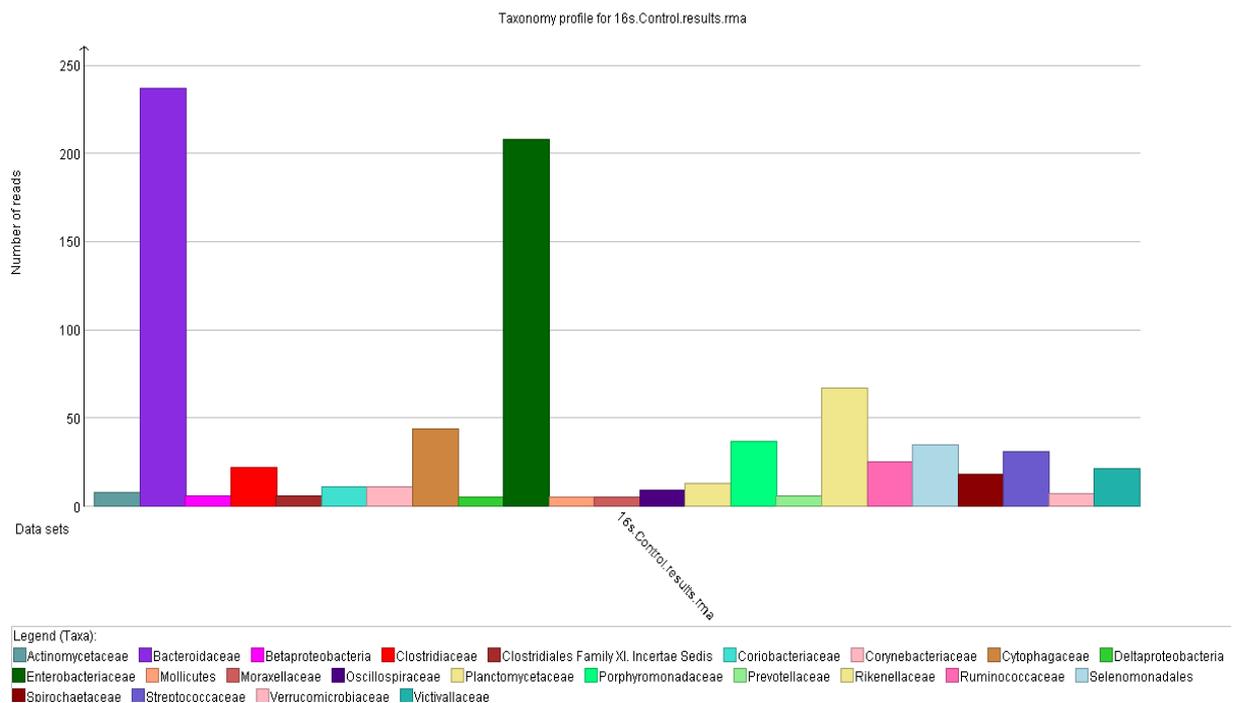


Figura 3 – Diversidade bacteriana apresentada no perfil saudável.

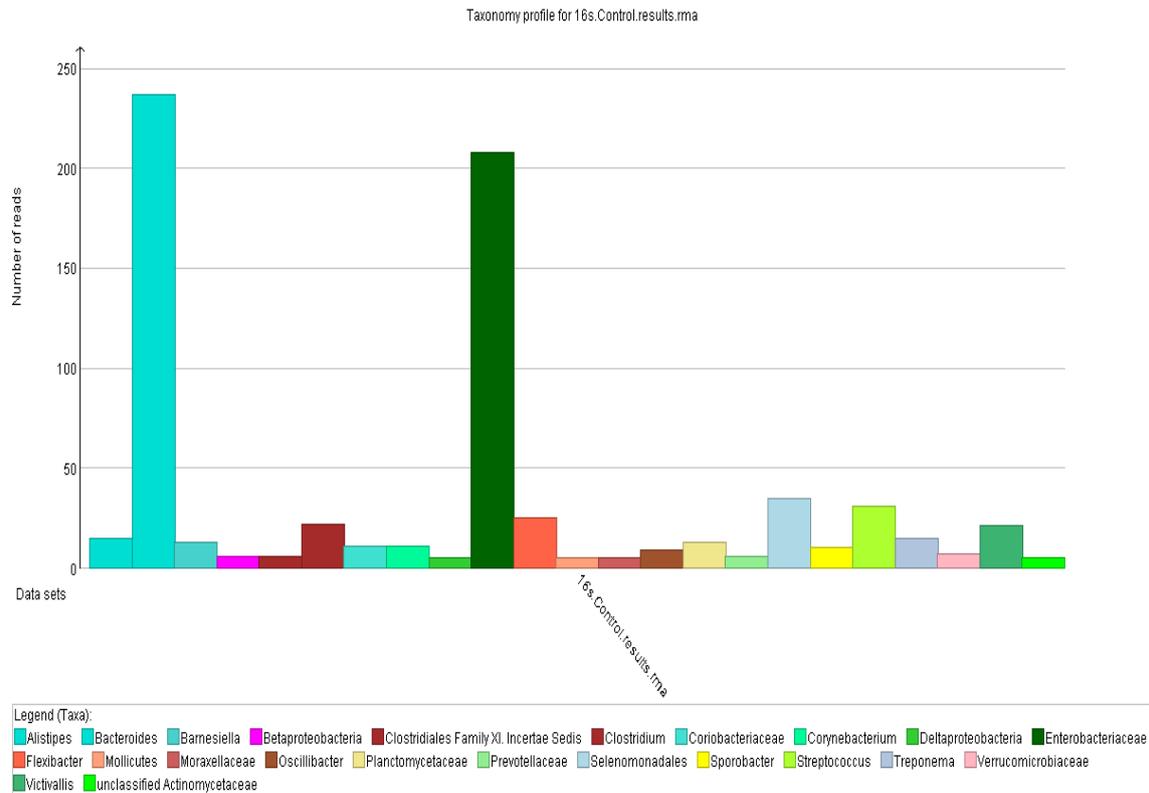


Figura 4 – Gêneros bacterianos observados no perfil saudável.

Animais com distúrbios reprodutivos apresentaram uma maior diversidade e riqueza de taxa, estando presentes 92 famílias e mais de 100 gêneros. Os taxa mais representativos foram: Enterobacteriaceae (15556 reads, 26,88%); Bacteroidaceae (13272 reads, 22,93%); Cytophagaceae (2741 reads, 4,73%); Pasteurellaceae (8188 reads, 14,14%); Porphyromonadaceae (2055 reads, 3,55%); Rikenellaceae (3582 reads, 6,18%); Victivallaceae (1986 reads, 3,43%); *Alistipes* (818 reads, 2,67); *Barnesiella* (827 reads, 2,70%); *Clostridium* (662 reads, 2,16%); *Flexibacter* (1393 reads, 4,55%); *Histophilus* (5472 reads, 17,90%); *Oscillibacter* (313 reads, 1,02%); *Phascolarctobacterium* (452 reads, 1,47%); *Prevotella* (153 reads, 0,50%); *Rikenella* (180 reads, 0,58%); *Streptococcus* (876 reads, 2,86%); *Treponema* (855 reads, 2,79%); *Victivallis* (1985 reads, 6,49%) (Fig. 5 e Fig. 6).

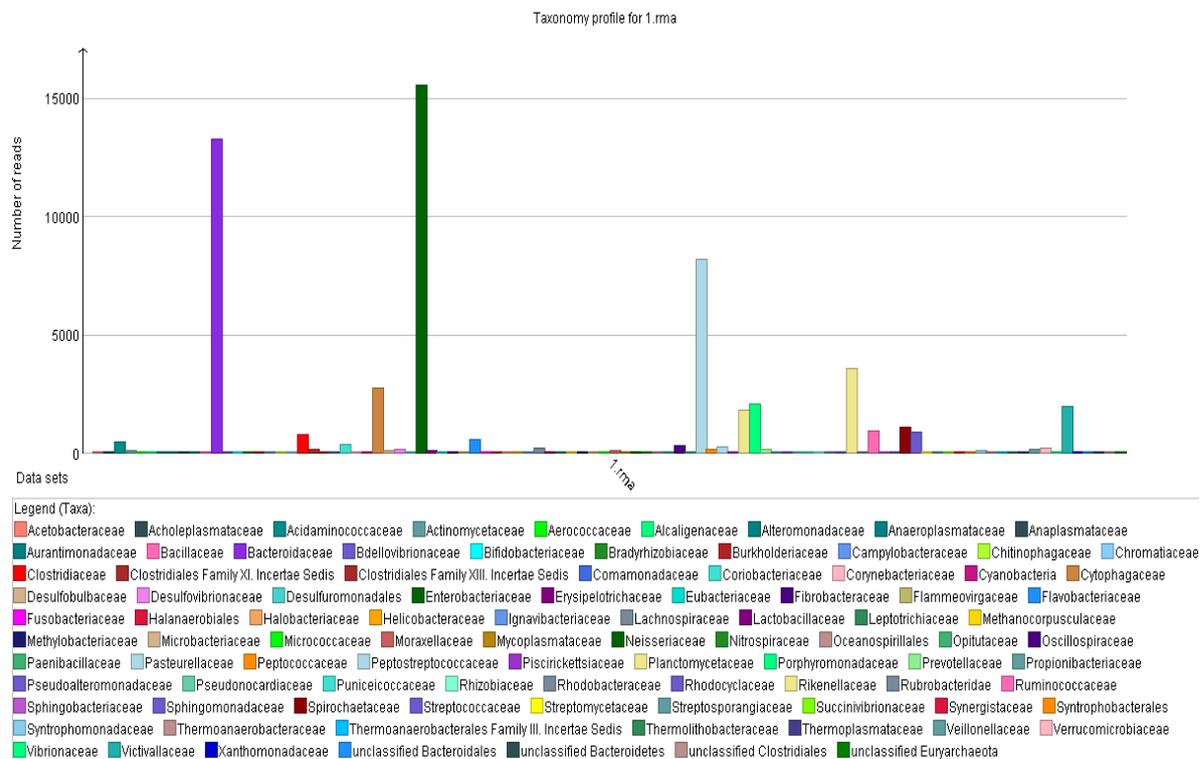


Figura 5 – Famílias bacterianas encontradas no perfil doente.

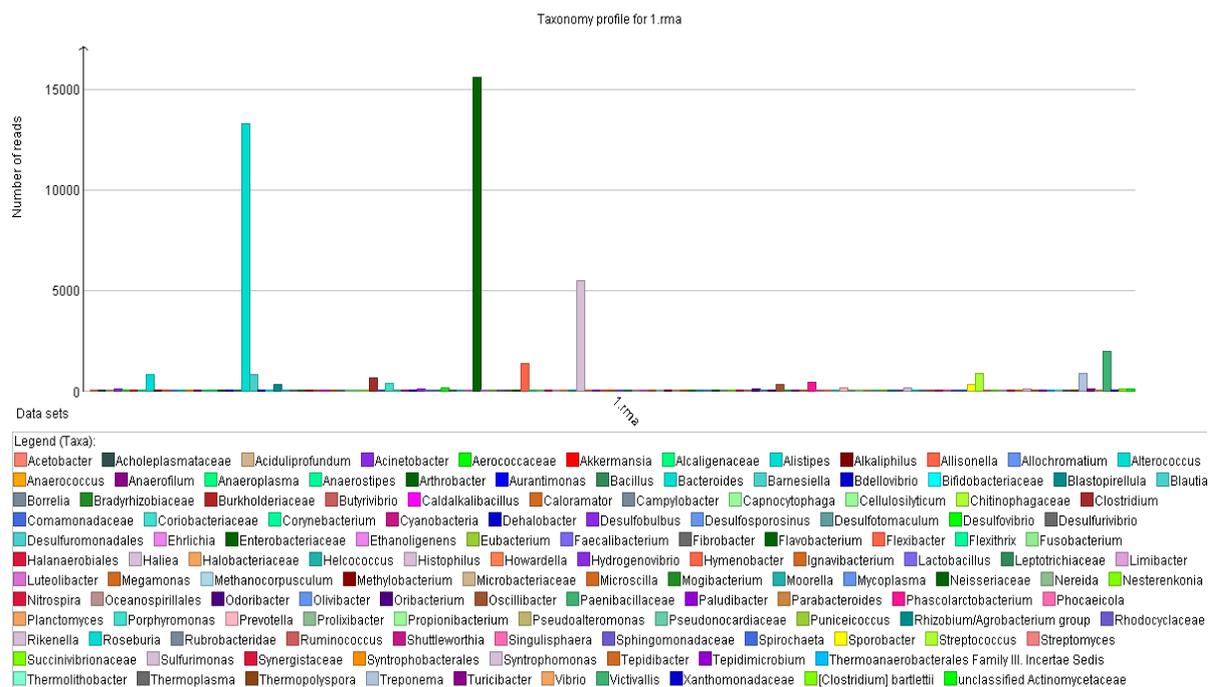


Figura 6 – Diversidade e representatividade de gêneros bacterianos observados no perfil doente.

A comunidade habitando animais sadios teve os seguintes atributos microbianos associados: resultado para teste de Gram negativo, modo de vida associado a hospedeiro, ausência de mobilidade, crescimento ótimo em 37°C, anaeróbias, não

patogênicas, forma de cocos e faixa de temperatura mesofílica. Os atributos microbianos do perfil com distúrbios reprodutivos foram de diversidade mais ampla, incluindo taxa causadoras de patologias em diversas espécies, sendo as enfermidades de grande espectro: pneumonia, artrite, miocardite e distúrbios reprodutivos. As espécies bacterianas deste perfil ainda apresentaram diferentes níveis de requerimento de oxigênio, uma temperatura ótima de crescimento variável e um modo de vida que vai de comensal a patogênico oportunista e estritamente patogênico, presença de mobilidade e diversos tipos de morfologias (Fig. 7).

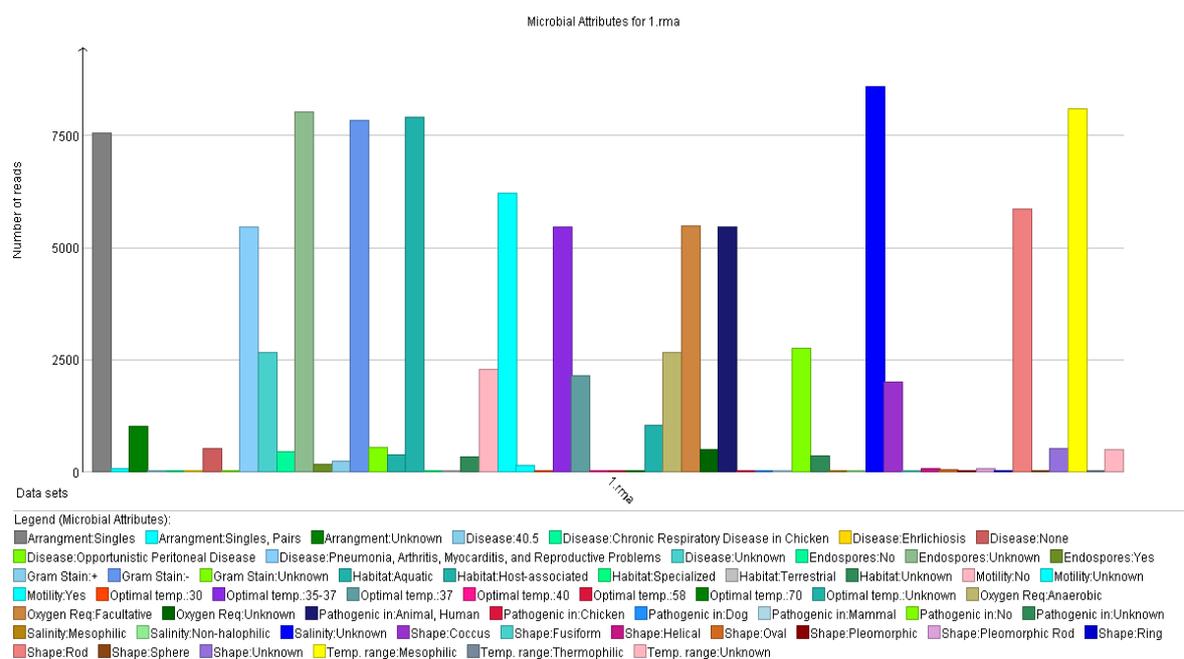


Figura 7 – Atributos microbianos da comunidade estabelecida no perfil doente.

Quando comparamos as duas comunidades é evidente o aumento de diversidade e densidade populacional dos grupos presentes nos indivíduos com distúrbios reprodutivos. Nesta condição é observada um acréscimo de grupos bacterianos ausentes na condição saudável, que é acompanhada por uma maior representatividade de taxa que também foram encontradas habitando a região genital de vacas saudáveis. As famílias Enterobacteriaceae, Porphyromonadaceae, Coriobacteriaceae, Cytophagaceae, Corynebacterineae, Bacteroidaceae, Streptococcaceae, Victivallaceae, além dos gêneros *Selenomonadales*, *Treponema* e *Victivallis* apresentaram um grande crescimento no estado doente e são grupos conhecidos por comporem a microbiota vaginal natural de vacas (Otero et al., 2000; Panangala et al., 1978).

Lactobacilos são apontados como barreira primária contra infecção por patógenos genitais (Redondo-Lopez et al., 1990) através de uma combinação de exclusão estérica e produção de substâncias inibitórias. Ácido lático produzido através da fermentação de carboidratos auxilia na manutenção do pH vaginal, agindo como barreira química para infecção de espécies invasoras (Tomás Juárez et al., 2003). Algumas espécies de *Lactobacillus* ainda produzem H₂O₂ e substâncias semelhantes à bacterioricinas que poderiam agir sobre espécies bacterianas patogênicas (Ocana et al., 1999). Os lactobacilos produtores de H₂O₂ estão presentes em maior quantidade no trato genital de mulheres saudáveis, enquanto a ausência delas torna a mulher mais susceptível a infecções bacterianas durante a gravidez (Hillier et al., 1993). É assumido que este grupo está associado a um mecanismo de defesa antimicrobiano não específico no ecossistema de vaginas saudáveis (Redondo-Lopez et al. 1990) e lactobacilos foram descritos como constituintes da microbiota natural do trato genital de vacas (Otero et al., 2000). No presente estudo, porém, não foram identificados lactobacilos na comunidade pertencente a indivíduos saudáveis, indicando que as vacas saudáveis estudadas não apresentam esta barreira natural característica.

O gênero *Barnesiella* está entre os taxa que estão presentes nas duas condições, tendo uma maior representatividade no estágio saudável (13 reads do total de 721 em comparação com os 827 reads do total de 30.565 dos gêneros presentes da condição doente). Espécies do gênero *Barnesiella* vêm sendo apontadas como capazes de impedir a colonização de bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Enterococcaceae em superfícies mucosas como o intestino, onde estes grupos tendem a se expandir e dominar (Ubeda et al, 2013). Bactérias da família Enterobacteriaceae são conhecidas por serem patógenos oportunistas, que podem produzir endotoxinas e piorar um quadro de infecção.

Além de Enterobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Moraxellaceae e Prevotellaceae também podem piorar quadros de infecção já existentes e agir como patógenos em determinadas circunstâncias (como diante de uma fase de imunossupressão). *Prevotella* coloniza através de junção ou ligação a outras bactérias em adição a células epiteliais, criando uma infecção mais intensa em áreas com infecção prévia. Muitas espécies são conhecidas pela resistência a antibióticos e podem causar uma ampla variedade de doenças, inclusive no trato genital (Yoon et al, 2003).

Outro fator que auxilia na adesão dos patógenos nos indivíduos com distúrbios reprodutivos é a produção de muco polissacarídeo utilizada por muitos grupos para facilitar a locomoção através de deslizamento. Ainda, grupos como Mycoplasmataceae são formadores de biofilmes que ajudam no acúmulo de pequenas massas de bactérias patogênicas no trato genital, criando um microambiente propício para a proliferação bacteriana que é capaz de oferecer proteção à ação de antibióticos e do próprio sistema imune do hospedeiro. Mycoplasmataceae são habitantes naturais do trato genital de gado, mas podem se tornar patogênicas (Nicholas et al., 2008). A representatividade do grupo no estágio doente, porém, não é tão marcante sugerindo que pode estar contribuindo com o quadro de infecção, mas provavelmente não como patógeno primário.

A transição de comensalismo para parasitismo pode ser desencadeada por mudanças no sistema imune do hospedeiro ou da microbiota (Calderone, 2001). A invasão do ambiente por novos grupos bacterianos pode ter levado a um desequilíbrio ecológico que por sua vez permitiu a proliferação desenfreada de espécies patogênicas que não são características da microbiota natural (ou caso fossem, em situação normal agissem como comensais). Mudanças em comunidades microbianas foram descritas ocorrendo tanto por supressão (Manichanh et al., 2006; Ott et al., 2004) quanto pela colonização por novos grupos (Fredricks et al., 2005).

Há importantes mudanças ambientais na transição do estágio sadio para o doente. Na condição sadia encontramos uma microbiota predominantemente anaeróbia, quando comparamos os grupos bacterianos presentes fica claro que indivíduos com distúrbios reprodutivos passam por uma mudança na quantidade de oxigênio presente no ambiente. Em tratos genitais com sintomas de patogenia há predominância de taxa com requerimento de oxigênio facultativo, aparecendo inclusive grupos aeróbios. Exemplos que ilustram essa nova condição incluem *Singulisphaera* (Kulichevskaya et al., 2008), *Olivibacter* (Wang et al., 2008) e Comamonadaceae (Willems et al., 1991). *Fibrobacter* e *Lactobacillus* são grupos que vivem em ambientes acidófilos e aparecem apenas no perfil doente, sugerindo que há uma diminuição do pH que pode ser resultado da produção de substâncias ácidas provenientes dos metabolismos fermentativos destas bactérias e de grupos anaeróbios como *Victivallis* (Zoetendal et al., 2003) e *Bacteroides*. A disponibilização de compostos orgânicos e íons para o metabolismo bacteriano na condição doente pode ser facilitada pela presença de bactérias como *Bdellovibrio*, um

parasita intracelular (Seidler e Starr, 1969) conhecido pelo seu ciclo celular que pode levar a lise total ou parcial das células hospedeiras liberando, desta forma, metabólitos e nutrientes para a comunidade. A presença de espécies que fermentam mucina, como *Akkermansia muciniphila*, pode contribuir para facilitação do quadro de infecção, uma vez que esta substância está relacionada à defesa contra patógenos (Derrien et al, 2004).

Histophilus é um conhecido oportunista que habita o trato genital bovino e pode causar uma grande variedade de distúrbios (van der Burgt et al., 2007). Os sintomas apresentados pelos distúrbios reprodutivos causados por este grupo englobam a sintomatologia dos locais afetados do perfil doente, o que, juntamente com a grande representatividade do grupo (5 mil reads no perfil doente) pode significar que se trata de um dos principais contribuintes para o quadro de infecção. Grupos de bactérias que reduzem metano, tais como Succinivibrionaceae (Stackebrandt and Hespell, 2006), podem estar favorecendo o metabolismo de *Histophilus* que ainda pode utilizar os produtos metabólicos de *Methanocorpusculum*, *Desulfovibrio* e *Desulfobulbus*, todos presentes no perfil doente. *Desulfovibrio* reduz o sulfato (Voordouw, 1995) liberado da fermentação da mucina por *Akkermansia muciniphila*. O sulfato pode ser oxidado por espécies de *Desulfobulbus* (Lien et al., 1998). *Methanocorpusculum* utiliza H₂CO₂ ou formato em seu processo metanogênico (Garcia et al., 2006). Estas reações podem favorecer o metabolismo de *Histophilus* que é baseado na utilização de metano, nitrogênio e enxofre, o que poderia levar a um agravamento da infecção devido ao crescimento populacional deste grupo.

Arcanobacterium pyogenes é uma espécie pertencente à família Actinomycetaceae que se mostra uma outra candidata interessante para o desencadeamento do processo de infecção. *A. pyogenes* atua como bactéria oportunista uma vez que se multiplica sobre feridas superficiais na pele ou mucosa de animais, desencadeando processos infecciosos piogranulomatosos (Jost e Billington, 2005). Possui atividade leucotóxica e hemolítica (Narayanan et al, 1981), o que acarreta a formação de abscessos com desenvolvimento de bastante pus e extensa fibrose, o que torna seus processos infecciosos de difícil resolução tecidual (Giuffrida e Bignarde, 2011). Moléculas citotóxicas colesterol dependentes produzidas pela espécie são atraídas a domínios ricos em colesterol nas membranas celulares, onde elas se agregaram e formam um poro, levando a morte osmótica das células alvo que muitas vezes incluem macrófagos. *A. Pyogenes* atua comumente associada a duas espécies:

Fusobacterium necrophorum e *Prevotella melaninogenica*. No presente estudo, espécies de *Fusobacterium* estavam presentes apenas na condição com distúrbios reprodutivos, enquanto *Prevotella* apareceu nas duas condições. A atuação em conjunto que demonstra a relação ecológica presente entre estas três espécies se dá pelo fato de *Fusobacterium necrophorum* produzir uma leucotoxina, enquanto *Prevotella melaninogenica* produz uma substância que impede a fagocitose e *A. Pyogenes* produz, além de substâncias citotóxicas já mencionadas, um fator de crescimento para *Fusobacterium necrophorum* (Sheldon et al, 2009). *A. Pyogenes* pode atuar como patógeno primário, mas sua infecção muitas vezes segue um trauma microbiano ou físico na membrana mucosa que permite a dispersão do patógeno. Desta forma, a transição de organismo comensal para parasita ocorre muitas vezes de forma autógena (Jost e Billington, 2005).

A relação entre bactérias patogênicas anaeróbias e aeróbias nos animais doentes pode ainda significar um caso de sinergia bacteriana, um fenômeno que pode estar influenciando a instalação da inflamação e desenvolvimento dos sintomas nos animais afetados. Falamos de sinergia quando grupos distintos de bactérias trabalham em conjunto para amplificar o quadro infeccioso. Isto é bastante estudado em doenças causadas por bactérias em modelos animais e nossos dados sugerem que algo parecido pode estar acontecendo na comunidade bacteriana presente nos indivíduos com distúrbios reprodutivos. Meleney já apontava em 1931 a importância das interações bacterianas não apenas para o processo infeccioso, mas também como essas interações podem influenciar os resultados de uma terapia com antibióticos. Estudos envolvendo a instauração e desenvolvimento de abscessos intra-abdominais em animais modelo apontaram o envolvimento de bactérias anaeróbias e facultativas no desenvolvimento dos sintomas.

Montravers et al (1998) enquanto estudava o melhor tratamento para peritonite polimicrobiana em camundongos percebeu que a característica diversificada da infecção não poderia ser ignorada para alcançar o melhor resultado possível na erradicação das bactérias patogênicas. Observou também que a persistência das bactérias (e sintomas associados) após o tratamento com antibióticos mono-específicos indicava que bactérias aeróbias e anaeróbias estavam trabalhando em conjunto no desenvolvimento da inflamação.

De forma similar, Metzger e Sun (2013) estudaram o papel da sinergia bacteriana no desenvolvimento de inflamações e disfunção imune que segue infecção pelo vírus Influenza. *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* são as bactérias mais comuns envolvidas nesse processo inflamatório, sendo o controle e remoção delas um trabalho difícil em pacientes hospitalares. Indo além da interação bactéria-bactéria, a presença do vírus pode extrapolar as interações microbianas, ampliando a discussão sobre sinergia a um âmbito vírus-bactéria(s).

A infecção polimicrobial comum em pacientes com diabetes do tipo dois também é um caso de sinergia bacteriana como mostrado por Mastropaolo et al (2005), participando do desenvolvimento do quadro infeccioso bactérias anaeróbias, aeróbias e anaeróbias facultativas. A sinergia foi comprovada pelo aumento estatisticamente significativo na quantidade das bactérias quando inoculadas em conjunto com outras bactérias comparado a quando são inoculadas sozinhas em camundongos diabéticos, usados como modelos in vivo.

É provável que as vacas com distúrbios reprodutivos apresentam uma infecção polimicrobial em que as bactérias agem em sinergia para potencializar a proteção contra o sistema imune do hospedeiro e aumentar a sua sobrevivência, assim como a interação de diferentes fatores de virulência provenientes de grupos distintos pode estar influenciando o desenvolvimento dos sintomas e da infecção como um todo. Controlar uma infecção polimicrobiana pode se mostrar um desafio, uma vez que a eliminação de espécies competidoras apenas causará a proliferação das demais. Ainda, espécies em sinergia podem estar produzindo fatores de crescimento para outras além de disponibilizar mais nutrientes e minerais para a comunidade como um todo. É o caso da disponibilidade de ferro, um importante limitador para o crescimento de bactérias que necessitam deste nutriente essencial para seus metabolismos.

Hospedeiro e patógeno travam uma verdadeira batalha pelo ferro no organismo, sendo comuns mecanismos em que o hospedeiro tenta remover ferro do ambiente para dificultar o crescimento de espécies invasoras. Grupos como *Bacteroides* são conhecidos por emitirem enzimas que disponibilizam mais ferro para seu crescimento (e como consequência, para as demais bactérias presentes no ambiente). Isto ocorre pela produção de hemolisina e hemoglobina protease que juntas promovem a lise de células vermelhas e libera nutrientes no ambiente, estimulando o crescimento bacteriano.

Bacteroides é um dos grupos mais abundantes nos dois estados estudados (juntamente com Enterobacteriaceae). Este grupo é notável pela abundância de fatores de virulência que incluem, além do seqüestro de ferro do hospedeiro, cápsula poli e lipopolissacarídica, mecanismos de aderência, proteases, enzimas hidrolíticas, neuramidase, enterotoxinas e outros mecanismos de defesa que visam evadir os neutrófilos do sistema imune. Inibição de fagocitose e produção de compostos que competem com opsoninas do hospedeiro para reduzir a opsonização bacteriana são outras características que favorecem não apenas o crescimento de *Bacteroides*, mas também de outras bactérias da comunidade.

Devemos considerar ainda a mudança de pH observada no estado doente. As bactérias observadas no estado doente possuem a produção de succinato como um dos metabólitos mais abundantes (principalmente Enterobacteriaceae, um dos grupos mais representativos), causando um pH mais ácido, ótimo para inibição da função de neutrófilos. O pH mais baixo ainda pode alterar a distribuição dos leucócitos, prejudicando ainda mais a resposta imune do hospedeiro. Além destas características, *Bacteroides* ainda induz a deposição local de fibrina, dificultando a limpeza das bactérias pelo sistema imune.

Por fim, *Streptococcus* é um dos grupos presentes na microflora vaginal dos animais com distúrbios reprodutivos e contém espécies como *Streptococcus agalactiae*, um causador conhecido de mastite bovina e residente no aparelho genital do gado. *Streptococcus agalactiae* possui diversos mecanismos e fatores de virulência que promovem a invasão da superfície mucosa da vagina, sendo o pH ácido ótimo para aderência desta espécie e começo do processo infeccioso. Assim como *Bacteroides*, *Streptococcus* apresenta mecanismos para resistir a fagocitose de células de defesa (macrófagos), além de também produzir hemolisinas.

Podemos observar as principais mudanças ocorridas na comunidade bacteriana na transição para o estado com distúrbios reprodutivos no esquema abaixo:

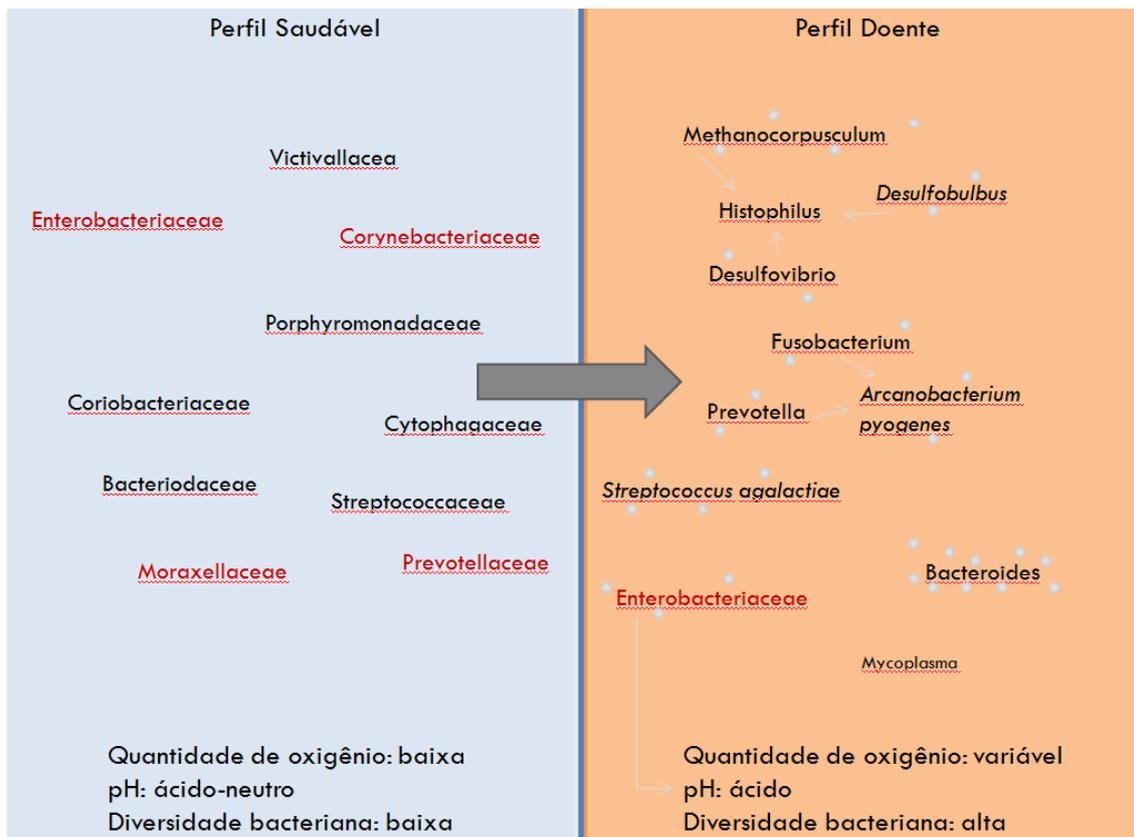


Figura 8 - Diagrama resumindo de forma simplificada a comunidade bacteriana e o ambiente relacionado ao dois perfis estudados.

No diagrama, encontramos as famílias presentes em maior quantidade em ambos os estados, estando destacadas as que são conhecidas por agirem como patógenos em determinadas circunstâncias. Temos ainda no perfil doente as relações ecológicas entre os gêneros patogênicos e uma ilustração da ação protetora de *Bacteroides* e da diminuição de pH ocasionada por Enterobacteriaceae, além da quantidade baixa de *Mycoplasma* observada ao longo das análises.

A nova conformação da microbiota vaginal em vacas doentes aponta que os fatores patogênicos dependem da combinação de espécies presentes no local e da interação dos diferentes fatores de virulência dessas espécies. Mais que isso, dependem dos produtos metabólicos que estas espécies estão produzindo no ambiente e como estes interagem com os metabólitos das demais espécies da comunidade.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou uma visão mais ampla sobre o que poderia estar desencadeando a infecção nos indivíduos afetados por distúrbios reprodutivos. A sintomatologia indicava micoplasmose, mas com a utilização da metagenômica foi possível observar que o quadro era mais complexo que se pensava inicialmente. A comunidade estabelecida na condição enferma difere tanto em diversidade quanto em quantidade de grupos bacterianos presentes quando comparada ao estado sadio. Nossos dados sugerem que ocorre uma mudança no ambiente que favorece a proliferação de bactérias que fazem a transição de comensal para oportunista, contribuindo para o agravamento do quadro infeccioso. Relações ecológicas estão bem estabelecidas na microbiota de indivíduos doentes, ocorrendo possível formação de microambientes que constituem o habitat ideal para o crescimento populacional de espécies patogênicas. *Arcanobacterium pyogenes*, *Histophilus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Mycoplasmataceae* são taxa que agravam infecções previamente estabelecidas, podendo agir também como patógenos primários em condições específicas. A sinergia ocorrente no grupo afetado por distúrbios reprodutivos é mais uma indicação de que os patógenos podem estar se protegendo mutuamente das tentativas do sistema imune de erradicá-los, garantindo desta forma a sobrevivência e proliferação dos grupos infectantes. Não se trata, portanto, de sintomas causados pela presença e ação de um único grupo bacteriano e sim de uma mudança no ecossistema que veio acompanhada (ou foi causada) pela colonização de espécies patogênicas ou proliferação de comensais que realizaram a transição para um estágio parasitário. Não está claro se a mudança no ambiente permitiu a instalação e crescimento de grupos patogênicos ou se a invasão e o aumento populacional destas espécies ocasionaram as mudanças ambientais e ecológicas observadas. Os resultados alcançados por este estudo reforçam a dificuldade enfrentada pelos criadores ao tentar combater distúrbios reprodutivos em seus rebanhos. Uma vez que se trata de uma nova comunidade bacteriana, com características ambientais e ecológicas próprias, o combate a um grupo patogênico pode não ser suficiente, pois pode levar a eliminação de um competidor que apenas fortaleceria as demais espécies que estão contribuindo para o desenvolvimento do quadro infeccioso. O estágio patogênico deve ser tratado com a complexidade que apresenta, não se deixando de fora as relações existentes na comunidade e possíveis conseqüências de utilização desenfreada de antibióticos. Estudos posteriores são necessários para maior

compreensão da microbiota estabelecida em casos de distúrbios reprodutivos, a fim de determinar tratamentos mais eficientes contra estas patologias.

6. REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. et al. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, p. 237-365, maio 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Humans Have Ten Times More Bacteria Than Human Cells: How do Microbial Communities Affect Human Health? **Science Daily**, 5 jun. 2008.

AZAM, F. Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. **Science**, vol. 280, n. 5364, p. 694-696, maio 1998.

BELKAID, Y., SEGRE, J. Dialogue between skin microbiota and immunity. **Science**, vol. 346, n. 6212, p. 954-959, nov. 2014.

CASWELL, JL, ARCHAMBAULT, M. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. **Animal Health Research Reviews**, vol. 6, n. 02, p. 161-186, dez. 2007.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of Candida albicans. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-336, jul. 2001.

COLE, J.R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 141-145, nov. 2009.

COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D. L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2553-2557, jun. 1999.

CURRIN, J. F. et al. Mycoplasma in Beef Cattle, **Virginia Cooperative Extension**, maio 2009.

DERRIEN, M. et al. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 54, p. 1469-1476, set. 2004.

DOIG et al. Bovine Genital Mycoplasmosis. **The Canadian Veterinary Journal**, vol. 22, p. 339-343, nov. 1981.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The state of food and agriculture. Rome, 2010.

FREDRICKS, D.N.; FIEDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M. Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. **New England Journal of Medicine**, vol. 353, p. 1899-1911, nov. 2005.

GARCIA, J.-L., et al. The Order Methanomicrobiales, In: Dworkin, M., Falkow, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H., STACKEBRANDT, E. (Eds.) *The Prokaryotes*. **Springer New York**, p. 208-230, 2006.

GIUFFRIDA, R.; BIGNARDE, P.C. Perfil de sensibilidade micorbiana *in vitro* de linhagens de *Arcanobacterium pyogenes* isoladas de diferentes afecções em bovinos. **Comunicação Veterinária e Zootecnia**, vol. 18, p. 222-225, jun. 2011.

GOLL, J., et al. METAREP: JCVI metagenomics reports—an open source tool for high-performance comparative metagenomics. **Bioinformatics**, vol. 26, n. 20, p. 2631–2632, aug. 2010.

GRAHAM, D. E., et al. An archaeal genomic signature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97, n. 7, p. 3304–3308, dez. 2000.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 68, n.4, p. 669–685, dez. 2004.

HILLIER, S.L., et al. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. **Clinical Infectious Diseases**, vol.16, n. 4, p. 273-S281, jun. 1993.

HENNE, A., et al. Construction of Environmental DNA Libraries in *Escherichia coli* and Screening for the Presence of Genes Conferring Utilization of 4-Hydroxybutyrate. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 65, n. 9, p. 3901-3907 set. 1999.

HUGENHOLTZ, P., et al. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, vol. 180, n. 18, p. 4765–4774, set. 1998.

JOST, B. H., BILLINGTON, S. J. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 88, no. 2, p. 87-102, aug. 2005.

KNIGHT, R., et al. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. **Nature Biotechnology**, vol. 30, p. 513–520, jun. 2012.

KULICHEVSKAYA, I.S., et al. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 58, n. 5, p. 1186-1193, maio 2008.

LENGELER, J., et al. *Biology of the Prokaryotes*. **Thieme**. Stuttgart, Germany. 1999.

LIEN, T., et al. *Desulfobulbus rhabdoformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. **International Journal of Systematic Bacteriology**, vol. 48, n. 2, p. 469-474, abr. 1998.

MANICHANH, C., et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, vol. 55, n. 2, p. 205-211, fev. 2006.

MASTROPAOLO, M.D., et al. Synergy in Polymicrobial Infections in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. **Infection and Immunity**, vol 73, n. 9, p. 6055-6063, set. 2005.

MELENEY, F.L. Bacterial synergy in disease process. **Annals of Surgery**, vol. 94, n. 6, p. 961-981, dez. 1931.

METZGER, D.W., SUN, K. Immune Dysfunction and Bacterial Coinfections following influenza. **The Journal of Immunology**, vol. 191, n. 5, p. 2047-2052, set. 2013.

MONTRAVERS, P., et al. Early bacterial and inflammatory responses to antibiotic therapy in a model of polymicrobial peritonitis in rats. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 4, n. 12, p. 701-709, dez. 1998.

NARAYANAN, S., et al. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* A. *pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, vol. 59, n. 3, p. 271-276, mar. 1998.

NICHOLAS, R., et al. *Mycoplasma* Diseases of Ruminants: Disease, Diagnosis and Control. **Research in Veterinary Science**, vol. 74, n. 2, abr. 2008.

NOONAN, J. P., et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. **Science**, vol. 314, n. 5802, p. 1113-1118, nov. 2006.

OCAÑA, V. S., et al. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. **Current Microbiology**, vol. 38, n. 5, p. 279-284, maio 1999.

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

OTT, S.J., et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut**, vol. 53, n. 5, p. 685-693, maio 2004.

PACE, N.R., et al. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. **ASM News**, vol. 51, p. 4-12, 1985.

- PANANGALA, V.S., et al. Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows. **The Canadian Veterinary Journal**, vol. 19, n. 4, p. 83-89, abr. 1978.
- PETERSON, J., et al. The NIH Human Microbiome Project. **Genome Research**, vol. 19, n. 12, p. 2317–2323, dez. 2009.
- PFÜTZNER, H., SACHSE, K. Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **International Office of Epizootics**, vol. 15, n. 4, p. 1477-1494, dez. 1996.
- POINAR, H. N., et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. **Science**, vol. 311, n. 5759, p. 392–394, dez. 2005.
- REDONDO-LÓPEZ, V., et al. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. **Reviews of infectious diseases**, vol. 12, n. 5, p. 856–872, oct. 1990.
- SANTOS et al. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 94, n. 1, p. 291–302, jan. 2011.
- SCHLOSS, P.D., et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 75, n. 23, p. 7537-7541, dez. 2009.
- SEIDLER, R.J., STARR, M.P. Factors Affecting the Intracellular Parasitic Growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* Developing Within *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, vol. 97, n. 2, p. 912-923, fev. 1969.
- SHANKS et al. Competitive Metagenomic DNA Hybridization Identifies Host-Specific Microbial Genetic Markers in Cow Fecal Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 72, n. 6, p. 4054–4060, jun. 2006.
- SHELDON, I.M., et al. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. **The Veterinary Record**, vol. 155, n. 13, p. 383-7, set. 2004.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 85, n. 2, p. 265–276, set. 2009.
- STALEY, J. T., KONOPKA, A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review of Microbiology**, vol. 39, p. 321–346, 1985.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – The key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 7, n. 5, p. 492–498, oct. 2004.

TLASKALOVA´-HOGENOVA, H., et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases, **Cellular & Molecular Immunology**, vol. 8, n. 2, p. 110–120, jan. 2011.

TOMÁS JUAREZ, M. S., et al. Estimation of vaginal probiotic lactobacilli growth parameters with the application of the Gompertz model. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 48, n. 1, p. 82–92, jan. 2002.

TYSON, G.W., et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, vol. 428, p. 37–43, mar. 2004.

UBEDA, C., et al. Intestinal Microbiota Containing *Barnesiella* Species Cures Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Colonization. **Infection and Immunity**, vol. 81, n. 3, mar. 2013.

VAN DER BURGT, G. Cattle fertility problems and *Histophilus somni*. **The Veterinary Record**, vol. 160, n. 17, p. 600, abr. 2007.

VOORDOUW, G. The genus *Desulfovibrio*: the centennial. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 61, n. 8, p. 2813-2819, aug. 1995.

YOON et al, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3: the Firmicutes. **Williams & Wilkins**, Baltimore, MD, 2003.

WAITES, K. B. , TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 17, n. 4, p. 697-728, oct. 2004,

WANG, C., et al. Isolation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism genes from complex microbial communities by phenotypic complementation of bacterial mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 72, n. 1, p. 84–391, jan. 2006.

WILLEMS, A., et al. Comamonadaceae, a New Family Encompassing the Acidovorans rRNA Complex, Including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). **International Journal of Systematic Bacteriology**, vol. 41, n. 3, p. 445-450, jul. 1991.

WOESE, C. R., et al. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 6, p.143–151, 1985.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, vol. 51, n. 4, p. 221–271, jun. 1987.

WOESE , C. R., KANDLER, O., WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 87, n. 12, p. 4576-4579, jun. 1990.

WOESE, C. R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97, n. 15, p. 8392–8396, 2000.

XU, J.P. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, vol. 15, n. 7, p. 1713-1731, jun. 2006.

ZOETENDAL, E.G., et al. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 53, p. 211-215, jan. 2003.