

**Dionei Joaquim Haas**

**QUIMIOTAXIA DE *Campylobacter fetus* POR SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS  
DO ÚTERO BOVINO GESTANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Andrey Pereira Lage

**Belo Horizonte**  
**UFMG – Escola de Veterinária**  
**2015**

H112q Haas, Dionei Joaquim, 1986-  
Quimiotaxia de *Campylobacter fetus* por substâncias químicas do útero bovino gestante  
/ Dionei Joaquim Haas. – 2015.  
66 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Campylobacter fetus* – Teses. 3. Quimiotaxia – Teses.  
4. Aborto nos animais – Teses. I. Lage, Andrey Pereira. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 693 6

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**DIONEI JOAQUIM HAAS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

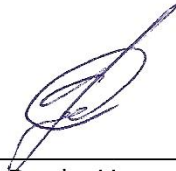
Aprovada em 12 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Andrey Pereira Lage  
Presidente - Orientadora



Prof. Geraldo Marcio da Costa  
Universidade Federal de Lavras



Prof. Geder Paulo Hermann  
Universidade Federal de Santa Maria - RS



Dra. Telma Maria Alves  
Escola de Veterinária - UFMG

## **Agradecimentos**

---

Aos meus pais, Vilson e Marli, pelo amor, apoio e incentivo incondicional em toda minha vida e nessa caminhada e por serem exemplos de seres humanos dignos e bons.

A meus irmãos, Diego e Darlise, pelo amor e carinho por toda a vida.

À minha companheira, Ana Caroline, pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

A meu orientador, Prof. Andrey, agradeço a oportunidade, orientação, confiança e os ensinamentos concedidos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Andréia, Carolina, Elaine, Ermilton, Ethiene, Frederico, Jamili, Luciana, Mayra e Telma pelo carinho e amizade.

A Escola de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela infraestrutura e qualidade de ensino.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, FAPEMIG e FEP-MVZ, pelo recurso financeiro para execução do experimento.

Muito obrigado a todos.

---

## SUMÁRIO

---

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	7
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>8</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>9</b>
3.1. <i>Campylobacter fetus</i> .....	9
3.2. CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA .....	11
3.3. PATOGENIA DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA .....	12
3.4. QUIMIOTAXIA .....	15
3.4.1. Os quimiorreceptores .....	16
3.4.2. Proteínas <i>Che</i> e a via de transdução do sinal quimiotático .....	17
3.4.3. O papel da quimiotaxia na colonização e patogênese da infecção por <i>Campylobacter</i> spp. ....	19
3.4.4. Demonstração e mensuramento <i>in vitro</i> da quimiotaxia .....	20
3.5. O ÚTERO BOVINO GESTANTE E INFECÇÃO POR <i>Campylobacter fetus</i> .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1. AMOSTRAS .....	26
4.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS AMOSTRAS .....	27
4.3. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS E DISCOS .....	27
4.4. SUSPENSÃO BACTERIANA .....	28
4.5. ENSAIO QUIMIOTÁTICO EM PLACA PARA <i>Campylobacter fetus</i> .....	28
4.6. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO QUIMIOTÁTICO EM PLACA ..	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Amostras de <i>C. fetus</i> utilizadas nesse estudo .....	26
Tabela 2 – Substâncias químicas e concentrações testadas nos ensaios de quimiotaxia para <i>C. fetus</i> .....	27

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Esquema simplificado de interações proteína-proteína durante a transdução do sinal quimiotático em bactérias .....	16
Figura 2 – Comportamento de natação das bactérias.....	18
Figura 3 - Ensaio quimiotático em placa para <i>C. fetus</i> .....	30
Figura 4 – Contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) nas suspensões de <i>C. fetus</i> utilizadas como inóculo nos ensaios de quimiotaxia .....	31
Figura 5 – Quimiotaxia de <i>C. fetus</i> por deoxicolato de sódio 0.1M (controle quimiorepelente), L – fucose 0.1M (controle quimioatraente) e PBS 0.01M pH 7.0 (controle não quimiotático/inerte) .....	32
Figura 6 – Quimiotaxia de <i>C. fetus</i> por fumarato, piruvato e succinato em diferentes concentrações .....	34
Figura 7 – Quimiotaxia de <i>C. fetus</i> por L - aspartato, L – glutamato e L – serina em diferentes concentrações .....	36
Figura 8 – Quimiotaxia de <i>C. fetus</i> por sulfato de ferro ferroso em diferentes concentrações ...	38
Figura 9 – Quimiotaxia das amostras Gáúcho e Grécia de <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> por progesterona em diferentes concentrações (ng/mL) .....	40

---

## LISTA DE ANEXOS

---

Anexo A - Quimiotaxia de <i>C. fetus</i> por substâncias químicas do útero bovino gestante.....	66
---	----

## RESUMO

*Campylobacter fetus* é um patógeno que coloniza o trato genital e placenta bovina, no entanto, os mecanismos envolvidos no tropismo tecidual deste microrganismo são desconhecidos. Vários mecanismos são importantes para a afinidade tecidual de *Campylobacter* spp., incluindo a quimiotaxia. Neste estudo foi avaliada a atividade quimiotática de ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos e íon inorgânico, componentes do muco uterino, nas concentrações entre 0.005M a 1M e hormônios produzidos pela placenta bovina nas concentrações entre 0.005 ng/mL a 500 ng/mL para duas amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* e quatro amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*. Meso-eritritol, 17 $\beta$ -estradiol e lactogênio placentário bovino não apresentaram atividade quimiotática, nas concentrações testadas, para as amostras avaliadas, enquanto deoxicolato de sódio foi quimiorrepelente. L-fucose, sulfato de ferro ferroso, fumarato de sódio, piruvato de sódio, succinato de sódio, L-aspartato, L-glutamato e L-serina foram quimioatraentes para as amostras avaliadas de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*. Progesterona foi quimioatraente, em concentrações acima de 50 ng/mL, para duas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*. Assim, este estudo demonstrou que substâncias químicas presentes no útero e placenta bovina atraem *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* e que duas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* foram atraídas por altas concentrações de progesterona.

**Palavras-chave:** comportamento quimiotático, quimiodeteção, atração, progesterona.

## ABSTRACT

*Campylobacter fetus* is a pathogen that colonizes the bovine genital tract and placenta, however, the mechanisms responsible for the tissue tropism of this microorganism are unknown. Several mechanisms are important for tissue affinity of *Campylobacter* spp., including chemotaxis. In this study, the chemotactic activity of organic acids, amino acids, carbohydrates and inorganic ion, common uterine mucous components, in concentrations from 0.005M to 1M, and hormones produced by the bovine placenta, in concentrations of 0.005 ng/mL to 500 ng/mL, was evaluated for two strains of *C. fetus* subsp. *venerealis* and four strains of *C. fetus* subsp. *fetus*. Meso-erythritol, 17 $\beta$ -estradiol and bovine placental lactogen presented no chemotactic activity in the concentrations tested, while sodium deoxycholate was chemorepellent for all strains tested. L-fucose, iron ferrous sulfate, sodium fumarate, sodium pyruvate, sodium succinate, L-aspartate, L-glutamate and L-serine were chemoattractants for the evaluated *C. fetus* subsp. *venerealis* and *C. fetus* subsp. *fetus* strains. Progesterone was chemoattractant, in concentrations above 50 ng/mL, for two strains of *C. fetus* subsp. *fetus*. Thus, this study showed that chemical substances present in the bovine uterus and placenta attract *C. fetus* subsp. *venerealis* and *C. fetus* subsp. *fetus* and that two strains of *C. fetus* subsp. *fetus* were attracted by high concentrations of progesterone.

**Keywords:** chemotactic behavior, chemosensing, attract, progesterone.

## 1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina (CGB) é uma doença infecciosa sexualmente transmissível causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, bactéria que habita o trato genital dos bovinos, e é caracterizada por repetição de cios a intervalos aumentados e irregulares e abortos. A doença é responsável por repetições de cio, morte embrionária e abortamentos, infertilidade temporária ou permanente em algumas vacas, gerando perdas econômicas significativas em função de vacas que não ficam prenhes no final da estação de monta, de queda na quantidade de bezerros nascidos, de queda na produção de leite pela diminuição na quantidade de vacas em lactação, de queda na produção de carne, de custos com tratamento, de adoção de vacinação, de descarte precoce de animais e de restrição nas comercialização de sêmen e de animais. Os problemas reprodutivos nos bovinos também podem ocorrer pela infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, subespécie habitante do intestino dos animais, incluindo os ruminantes, e responsável por abortos esporádicos em bovinos e infertilidade e aborto enzoótico em ovinos.

Apesar do agente etiológico da doença ter sido descoberto a mais de um século (1913) por McFadyean e Stockman, na Inglaterra, e da grande importância econômica para a indústria mundial de bovinos, pouco ainda se sabe sobre o tropismo pelo útero gestante e sobre o aborto decorrente da infecção por *Campylobacter fetus*. A especificidade de hospedeiro e o tropismo tecidual são processos intimamente envolvidos com a patogenia das doenças infecciosas. O tropismo tecidual é a predileção do microrganismo por determinado tecido para colonização e crescimento. Essa predileção por um tecido do hospedeiro é em virtude daquele local específico possuir células com receptores específicos, bem como os nutrientes e fatores de crescimento essenciais, o pH adequado, a tensão de oxigênio e a temperatura ideal para o desenvolvimento do microrganismo. O início e o sucesso da infecção dependem do tropismo e da identificação pelo microrganismo do local adequado para a colonização do hospedeiro. As bactérias móveis identificam o local adequado para colonização por quimiotaxia, que é o movimento inato de bactérias em direção a um ambiente favorável ou para longe de um ambiente desfavorável. Diversos trabalhos envolvendo *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* tem demonstrado a importância do tropismo e da quimiotaxia na patogenia desses microrganismos. Com *C. jejuni*, estudos tem demonstrado que o microrganismo possui tropismo pelo trato intestinal e identifica por quimiotaxia os locais adequados no intestino para a colonização.

*C. fetus* possui marcado tropismo pelo trato genital e tecidos placentários bovinos. No entanto ainda não foram elucidados os mecanismos envolvidos no tropismo de *C. fetus* pelo trato genital e conseqüentemente a participação no abortamento. Não é conhecido o mecanismo responsável pela atração de *C. fetus* para o útero gestante, nem as substâncias químicas e fatores locais envolvidos na afinidade e localização tecidual. Hipotetiza - se que a quimiotaxia pode ser o mecanismo responsável pela afinidade do *C. fetus* pelo útero gestante e que substâncias presentes nesse tecido possam atuar como fatores quimioatratantes para a bactéria.

Nesse estudo foram avaliadas substâncias presentes ou sintetizadas pelo útero e placenta da vaca e que possam atuar como fatores quimioatratantes para *C. fetus*.

## 2. OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo avaliar substâncias presentes ou sintetizadas pelo útero e placenta da vaca como fatores quimioatratantes para *Campylobacter fetus*.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Campylobacter fetus*

*C. fetus* é um bastonete Gram-negativo, móvel, espiralado, em forma de vírgula ou “S”, possui um ou dois flagelos polares, e não é formador de esporos. Possui 0,2 a 0,8 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento. É microaerófilo, necessitando atmosfera rica em CO<sub>2</sub> (10%) e reduzida concentração de O<sub>2</sub> (5%) para seu crescimento (Debruyne et al., 2008). A sua forma espiralada e o característico movimento semelhante a “saca-rolhas” realizado pelo seu flagelo polar, proporcionam a *C. fetus* uma grande capacidade para mover-se no muco e colonizar superfícies mucosas (Lee et al., 1986).

Em ágar sangue, as colônias de *C. fetus* possuem de 1 a 2 mm de diâmetro, são cor róseo-acinzentado, redonda, convexa, lisa e brilhante, com borda regular e não hemolíticas. As colônias de *C. fetus* subsp. *fetus* já são bem desenvolvidas com 48 horas de crescimento, mas *C. fetus* subs. *venerealis* necessitam de 72 horas de crescimento. Para o isolamento primário é indicado a utilização de uma base rica nutricionalmente para o ágar sangue, como tioglicolato ou infusão de cérebro e de coração e incubar as amostras em microaerofilia, com uma mistura de 80% de N<sub>2</sub>, 10% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (Dekeyser, 1984). Em culturas velhas, em função de restrição de nutrientes e estresse metabólico, *C. fetus* podem assumir a forma coccóide, que são células viáveis, mas geralmente não cultiváveis em laboratório (Debruyne et al., 2008).

*C. fetus* é um microrganismo fastidioso, necessita de meios enriquecidos para o seu crescimento, sendo que a maioria das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* tem menor crescimento quando comparadas a amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* (Mohanty et al., 1966). A temperatura ótima de crescimento do *C. fetus* é 37°C. A bactéria cresce também, em uma taxa menor à 25°C, no entanto à 42°C somente algumas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* crescem (Firehammer e Berg, 1965). *C. fetus* são oxidase positivo, catalase positivo, urease negativo, reduzem nitratos, não hidrolisam o hipurato de sódio, a maioria das amostras são resistentes ao ácido nalidixico e todas são sensíveis a cefalotina (On, 2005).

A espécie *C. fetus* é dividida em três subespécies, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *testudinum*. *C. fetus* subsp. *fetus* habita o intestino e vesícula biliar de vários hospedeiros, como ruminantes, aves, répteis e seres humanos, pode também colonizar o trato genital bovino e é responsável por abortos esporádicos nos bovinos e infertilidade e aborto enzoótico nos ovinos (Stoessel, 1982; Dekeyser, 1984). *C. fetus* subsp. *venerealis* é o agente etiológico da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) e é isolado do trato genital dos bovinos, sendo responsável por infertilidade, morte embrionária e abortamento (Debruyne et al., 2008).

Uma amostra variante de *C. fetus* subsp. *venerealis* tolerante a glicina tem sido descrita, designada *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*, ela pode colonizar o trato genital e o trato intestinal dos bovinos (Véron e Chatelain, 1973; Garcia e Brooks 1993; Blaser et al. 2008). *C. fetus* subsp. *testudinum* tem sido isolado de fezes de répteis e em casos de diarreia, edema pulmonar e septicemia em seres humanos (Fitzgerald et al., 2014).

As subespécies de *C. fetus* podem ser diferenciadas por poucos testes bioquímicos. *C. fetus* subsp. *fetus* cresce na presença de glicina 1% e produz H<sub>2</sub>S em meio contendo cisteína, enquanto que *C. fetus* subsp. *venerealis* não (Dekeyser, 1984). Já *C. fetus* subsp. *testudinum* não pode ser diferenciado de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subs. *venerealis* por testes fenotípicos

convencionais, sendo necessário o uso da técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*) (Fitzgerald et al., 2014). Sorologicamente, *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 (Blaser et al., 2008).

Técnicas moleculares têm contribuído para diferenciar as subespécies de *C. fetus* entre elas AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Wagenaar et al., 2001), PCR (Hum et al., 1997), qPCR (Mcgoldrick et al., 2013), RFLP - PFGE (*Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism - Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (Salama et al., 1992; On e Harrington, 2001; Vargas et al., 2003), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e hibridização de DNA-DNA (Tu et al., 2005) e MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (van Bergen et al., 2005). A natureza microaerofílica de *C. fetus*, é atribuída a presença da superóxido dismutase, enzima que catalisa a conversão de radicais de oxigênio para oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos intermediários reativos do oxigênio para a célula bacteriana (Blaser et al., 2008).

*C. fetus* não utiliza carboidratos como fonte de carbono porque não possui a enzima fosfofrutoquinase, enzima que atua no metabolismo dos carboidratos, glicólise e produção de ATP, mas possui capacidade enzimática e de transporte para o catabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos (Parkhill et al., 2000). Consequentemente, o crescimento de *C. fetus* depende dos aminoácidos e ácidos orgânicos presentes nos tecidos do hospedeiro (Lee e Newell, 2006). O íon inorgânico ferro ferroso é um fator essencial para muitas espécies de bactérias, sendo um importante fator para a colonização e crescimento do *Campylobacter* spp. (Wooldridge e van Vliet, 2005).

A espécie *C. fetus* é altamente adaptada a superfícies mucosas, sendo que *C. fetus* subsp. *venerealis* possui alta afinidade pelo trato genital dos bovinos, enquanto *C. fetus* subsp. *fetus* é mais adaptada ao trato intestinal de seus hospedeiros, apesar de também colonizar o trato genital dos bovinos (Schurig et al., 1973, Blaser et al., 2008). *C. fetus* subsp. *fetus* possui marcado tropismo pelos tecidos placentários e fetais da vaca e da ovelha, invadindo o útero somente quando este está gestante (Garcia et al., 1983; Schurig et al., 1973), enquanto que o *C. fetus* subsp. *venerealis* pode invadir o útero gestante, principalmente quando o órgão está sob domínio hormonal da progesterona e além disso também pode invadir o útero não gestante (Schurig et al., 1974; Corbeil et al., 1975).

O genoma de *C. fetus* é relativamente pequeno, mas variável entre as diferentes amostras de *C. fetus* (Salama et al., 1992). O genoma do *C. fetus* possui aproximadamente 1.8 MB de tamanho, com conteúdo de G+C (guanidina+citosina) de 33 % (Blaser et al., 2008). *C. fetus* subsp. *venerealis* possui um genoma circular com 1.87 MB (Stynen et al., 2011), *C. fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius* 1.86 MB (Iraola et al., 2013; van der Graaf-van Bloois et al., 2014), *C. fetus* subsp. *fetus* 1.77 MB (Ali et al., 2012) e *C. fetus* subsp. *testudinum* 1.77 MB (Gilbert et al., 2013). A redução genômica evidenciada pelo genoma pequeno e a ausência de DNA não codificado do *C. fetus* são evidências típicas de bactérias patogênicas adaptadas a um nicho de colonização específico como tem sido documentado para as subespécies de *C. fetus* (Fouts et al., 2005; Hofreuter et al., 2008).

Estudos do genoma demonstram que *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius* possuem mais de 99 % de homologia a nível de DNA (Ali et al., 2012; Barrero et al., 2014; ). Em um outro estudo, Gilbert et al. (2013) observaram uma alta similaridade entre os genomas de *C. fetus* isolados de répteis e *C. fetus* isolados de mamíferos, no entanto, o proteoma de *C. fetus* de origem réptil e *C. fetus* de origem mamífera mostram uma identidade de aminoácidos de 94%, o que é menor do que entre *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* (> 99%).

Apesar das três subespécies de *C. fetus* serem extremamente relacionadas geneticamente, estáveis e apresentarem comportamento clonal, existem diferenças genéticas entre as subespécies que podem ser determinantes na capacidade de cada subespécie infectar diferentes hospedeiros (van Bergen et al., 2005). Estudos recentes demonstram que *C. fetus* subsp. *testudinum* isolados de répteis são distintos geneticamente de *C. fetus* isolados de mamíferos por MLST (Dingle et al., 2010; Wang et al., 2013). Os isolados de *C. fetus* subsp. *venerealis* apresentam menor diversidade genética comparado aos isolados de *C. fetus* subsp. *fetus* (van Bergen et al., 2005). Isso suporta a teoria proposta por Véron e Chatelain (1973) em que *C. fetus* subsp. *venerealis* é um clone mutante de *C. fetus* subsp. *fetus*, que é adaptado aos bovinos e raramente infecta outros hospedeiros, enquanto que o *C. fetus* subsp. *fetus*, por possuir maior diversidade genética é apto a infectar diferentes hospedeiros (Blaser et al., 2008).

Outros estudos têm demonstrado que existem diferenças marcantes entre os genomas de *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis*, sendo que apenas amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* possuem uma ilha de patogenicidade (Gorkiewicz et al., 2010; Ali et al., 2012), que é um subgrupo de ilhas genômicas que transporta fatores de virulência e é responsável pela adaptação de microrganismos patogênicos ao hospedeiro (Hacker et al., 1997; Schmidt e Hansel, 2004). Essa ilha de patogenicidade possui elementos característicos que são adquiridos por transferência horizontal e pode estar relacionada a adaptação da subespécie *C. fetus* subsp. *venerealis* ao hospedeiro bovino e ao tropismo pelo trato genital (Gorkiewicz et al., 2010; Ali et al., 2012). Já em um outro estudo, Barrero et al., (2014) observaram que *C. fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius* parece não ter ou conter uma ilha de patogenicidade muito divergente da encontrada em *C. fetus* subsp. *venerealis* .

### 3.2. Campilobacteriose Genital Bovina

CGB é terminologia utilizada atualmente para descrever a doença causada por *C. fetus* subsp. *venerealis* nos bovinos, no entanto, ela é também conhecida por campilobacteriose venérea bovina, em função da forma de transmissão da infecção e anteriormente, vibriose, em função da classificação inicial de seu agente etiológico, *Vibrio fetus* (Véron e Chatelain, 1973). A CGB, é uma doença venérea naturalmente transmitida durante a cópula de um touro infectado para uma vaca susceptível ou vice-versa ou durante a inseminação artificial com instrumentos ou sêmen contaminado (Stoessel, 1982).

As perdas econômicas decorrentes da CGB são representadas por falhas na implantação embrionária, morte embrionária e repetição deaios, infertilidade temporária ou permanente das fêmeas, abortamentos, vacas não prenhes no final da estação de monta, necessidade de maior frequência na reposição de touros, aumento do período entre partos e, conseqüentemente, queda na produção de bezerras nascidos, queda na produção de leite e carne, custo com tratamentos antimicrobianos e restrição na comercialização do sêmen e dos animais infectados (Alves et al., 2011). Estudos epidemiológicos indicam que a CGB é uma doença com distribuição mundial

(Mshelia et al., 2010; Alves et al., 2011) e é considerada uma das principais causas de perdas econômicas para a indústria de bovinos em diferentes partes do mundo (Mshelia et al., 2010).

A prevalência da infecção em touros de rebanhos de corte com mais de 500 animais no Brasil no ano de 2000, foi estudada por Miranda (2005). Foram incluídos neste estudo os Estados onde se localizava a maior população de bovinos de corte do país: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo e Tocantins. A prevalência de animais infectados por *C. fetus* foi de 19,7% (IC95%: 13,3 - 25,1%) e a prevalência de rebanhos infectados encontrada neste estudo foi de 50,8% (IC95%: 41,6 - 60,1%). Em um estudo realizado no Pantanal Matogrossense, foi encontrada uma prevalência de 52,3% de touros infectados e 89,5% de propriedades com animais infectados, mostrando que a CGB está amplamente disseminada nos rebanhos da região (Pellegrin et al., 2002).

A entrada da CGB em um rebanho ocorre geralmente pela introdução de animais infectados, geralmente touros. A infecção se difunde rapidamente, permanecendo inaparente no início, em geral pela falta de controle zootécnico dos rebanhos (Lage, 2001). A transmissão da CGB ocorre durante a cópula ou inseminação artificial. O agente pode passar de um touro infectado ou sêmen contaminado para uma fêmea susceptível, ou de uma fêmea infectada para um macho susceptível. Fômites, cama contaminada e comportamento homossexual entre animais jovens também podem se tornar vias de infecção (Lage e Leite, 2000).

O manejo reprodutivo com a utilização de monta natural, empregado na maior parte dos sistemas de produção extensivos e com baixo controle zootécnico apresenta todos os fatores de risco necessários à manutenção da CGB em um rebanho (Pellegrin, 2002). Os touros de repasse infectados com *C. fetus* podem manter a CGB em rebanhos que utilizam a inseminação artificial (Stynen et al., 2003).

A infertilidade e abortamentos nos bovinos é causada esporadicamente por *C. fetus* subsp. *fetus*. A transmissão da infecção é por via fecal-oral, sendo que os animais adquirem a infecção ao ingerir alimentos e água contaminada com o microrganismo. O aborto esporádico causado por *C. fetus* subsp. *fetus* representa menos de 5% dos casos de abortos por *C. fetus* nos bovinos, porém o microrganismo é responsável por infertilidade e abortos enzoótico nos ovinos (Dekeyser, 1984; Garcia e Brooks, 1993).

### 3.3. Patogenia da CGB

*C. fetus* é reconhecido como importante patógeno para a bovinocultura há mais de um século. Ambos, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* podem causar doença nos bovinos, porém apenas o *C. fetus* subsp. *fetus* causa doença nos ovinos. Os habitat naturais das três subespécies são diferentes, *C. fetus* subsp. *testudinum* habita o intestino de répteis e seres humanos (Fitzgerald et al., 2014), *C. fetus* subsp. *fetus* é reconhecido por ser confinado ao trato intestinal dos bovinos e ovinos, enquanto que o *C. fetus* subsp. *venerealis* coloniza o trato genital dos bovinos e a amostra variante *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* pode colonizar tanto o trato genital como o trato intestinal dos bovinos (Véron e Chatelain, 1973; Garcia e Brooks, 1993; Blaser et al. 2008).

No entanto, somente *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius* podem ser recuperadas de produtos de abortamentos nos bovinos (Skirrow, 1994; Campero et al., 2003; Blaser et al. 2008).

A espécie *C. fetus* é reconhecida por possuir marcado tropismo pelo trato genital e por se multiplicar nos tecidos placentários, sendo responsável por infertilidade e abortos nos bovinos e ovinos (Vandeplasseche et al., 1963; Stoessel, 1982; Garcia et al., 1983).

No touro, o *C. fetus* subsp. *venerealis* habita a cavidade prepucial, infectando as criptas prepuciais, multiplicando-se na mucosa das glândulas penianas e porção distal da uretra, não provocando lesões, sendo o macho portador assintomático e principal disseminador da infecção no rebanho (Clark, 1971; Eaglesome e Garcia, 1992). Touros mais velhos, que possuem maior número de criptas prepuciais mais profundas, propiciam condições ideais de microaerofilia para o crescimento do *C. fetus* subsp. *venerealis* no prepúcio (Clark, 1971). Além disso, esses animais tendem a exercer dominância sobre os mais jovens por ocasião da monta, o que aumenta os riscos de transmissão da doença (Stoessel, 1982; Cottorello, 2006).

Segundo Winter et al. (1981), a localização do microrganismo e a natureza da infecção no touro, dificultam o acesso e a resposta adequada do sistema imune local, causando uma inefetiva produção e transferência transepitelial de imunoglobulinas para o prepúcio, sendo fatores que contribuem para a mínima estimulação do sistema imune e prolongada sobrevivência do *C. fetus* subsp. *venerealis* no macho. A variação antigênica em alta frequência das proteínas de superfície SAP (Surface Array Protein) durante a infecção impossibilita ao sistema imune do hospedeiro responder prontamente a estas variações antigênicas, evitando a morte mediada por anticorpos de *C. fetus*. Além disso, a SAP confere resistência a morte mediada pelo complemento, impedindo a ligação do factor C3b do complemento à superfície celular do *C. fetus* e contribuem para o desenvolvimento do estado de portador em touros e em vacas (Samuelson e Winter, 1966; Garcia et al., 1995; Thompson, 2002).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* não produz nenhuma mudança no comportamento normal do touro, nem modifica sua libido nem a capacidade fecundante e qualidade de seu sêmen. A única alteração que pode ser observada no touro, ao final de uma estação de monta, é um desgaste físico, em função do maior número de coberturas que o reprodutor tem de realizar, decorrente das fêmeas que retornam ao cio em um rebanho infectado com *C. fetus* subsp. *venerealis* (Stoessel, 1982).

A CGB nas fêmeas é caracterizada por provocar alterações somente no trato genital não sendo detectada alterações sistêmicas (Stoessel, 1982). Os locais de infecção do *C. fetus* subsp. *venerealis* são a vagina, cérvix, útero e ovidutos. Em condições naturais, a transmissão da infecção ocorre durante a cópula e coito (Clark, 1971), sendo que o microrganismo é depositado na vagina e por infecção ascendente, atravessa a cérvix alcançando o útero e ovidutos (Corbeil, 1999). O microrganismo causa uma inflamação no útero que poderá inibir a implantação embrionária ou causar a morte do embrião já implantado. A inflamação pode se estender da vagina à mucosa do oviduto, incluindo cérvix e endométrio (Dekeyser, 1984).

A histopatologia da CGB em fêmeas não gestantes foi estudada por Vandeplasseche et al. (1963) e Corbeil et al. (1975). Apesar da presença do *C. fetus* subsp. *venerealis* nem sempre ser associada com alterações histológicas no trato genital, um achado frequente é endometrite leve. Menos frequentemente, uma resposta inflamatória leve pode ser observada na cérvix e ovidutos. As principais lesões observadas são as reações linfocitárias e plasmocíticas do endométrio, mas frequentemente com distribuição focal do que difusas. Essas lesões não são patognomônicas para a CGB e podem não ser suficiente para causar a infertilidade que é característica da doença. Vandeplasseche et al. (1963) ainda sugerem que a infertilidade pode ser causada pela combinação de uma leve endometrite e o efeito direto do *C. fetus* subsp. *venerealis* no concepto.

Schurig et al. (1974) observaram que o *C. fetus* subsp. *venerealis* introduzido experimentalmente por via intravaginal durante o estro não foi capaz de invadir o útero até chegada da fase progesterônica do ciclo estral. Garcia e Brooks (1993) afirmam que em condições naturais de infecção, o *C. fetus* subsp. *venerealis* é introduzido no trato genital da fêmea durante a fase estrogênica quando os neutrófilos são abundantes nas secreções e que os microrganismos que escapam da fagocitose são capazes de se multiplicar e invadir o útero durante a fase progesterônica quando a resposta neutrofílica é reduzida.

Corbeil et al. (1975) também demonstraram que durante a fase estrogênica, os neutrófilos são numerosos no útero, prevenindo que o *C. fetus* subsp. *venerealis* colonize o tecido nessa fase. Porém durante a fase progesterônica, quando poucos neutrófilos estão presentes no útero, o microrganismo é capaz de invadir e colonizar o tecido.

A influência dos hormônios estrógeno e progesterona na modulação da resposta imune frente a infecções bacterianas do trato genital já havia sido observada por outros estudos, que demonstraram que durante a fase estrogênica a resposta imune a bactérias é mais efetiva quando comparada a resposta imune durante a fase progesterônica, que é a fase mais susceptível a infecções por bactérias (Lewis, 2003; Fahey et al., 2005; García-Gómez et al., 2013).

A invasão do útero pelo *C. fetus* subsp. *venerealis* promove um estímulo antigênico, que resulta na produção de anticorpos IgG, principalmente no útero, e IgA na vagina (Garcia e BROOKS, 1993). A IgG possui as funções de imobilizar e um importante papel opsonizante na fagocitose do microrganismo pelos neutrófilos e células mononucleares, mas não na morte mediada pelo complemento. A IgA não é uma imunoglobulina opsonizante, porém ela imobiliza o organismo na superfície cérvico-vaginal e limita a entrada do patógeno no útero, facilitando a eliminação do *C. fetus* subsp. *venerealis*, particularmente durante o estro, ou o estabelecimento do estado de portador (Corbeil et al., 1974; Garcia e Brooks, 1993).

*C. fetus* possui afinidade pelos tecidos placentários e pode invadir o útero gestante em qualquer período da gestação, no entanto é consenso que os abortos decorrentes da infecção concentram-se entre o 4º ao 6º mês gestacional da vaca (Stoessel, 1982; Hum, 1987; Garcia e Brooks, 1993). Os mecanismos envolvidos na afinidade tecidual do microrganismo e os fatores que determinam a ocorrência dos abortamentos nesse período são desconhecidos.

Embora os mecanismos de patogencidade de *C. fetus* são pouco compreendidos, a quimiotaxia está envolvida com a afinidade tecidual e é um importante fator para a colonização de espécies de *Campylobacter* spp., como *C. jejuni* (Ferrero e Lee et al., 1988; Hugdahl et al., 1988; Takata et al., 1992; Yao et al., 1997, Hendixson e Dirita, 2004), *C. concisus* (Paster e Gibbons, 1986, Kaakoush et al., 2010; 2011; Lavrencic et al., 2012) e *C. rectus* (Rams et al., 1993; Yokoyama et al., 2005; Lagier et al., 2014).

Embora necessite de mais estudos, trabalhos recentes têm proposto que *C. fetus* compartilhe a nível genômico determinantes de virulência comum a outras espécies de *Campylobacter*, como genes que codificam receptores sensoriais transmembrânicos e as proteínas relacionadas a transdução do sinal na quimiotaxia (Moolhuijzen et al., 2009; Fahmy et al., 2012). Somado a esses importantes dados, Stynen (2009) verificou um aumento significativo na expressão de proteínas quimiotáticas após a passagem seriada de *C. fetus* subsp. *venerealis* em novilha, sugerindo que a quimiotaxia pode ser importante para a virulência e colonização de *C. fetus*.

A partir disso, hipotetiza –se que a quimiotaxia pode ser um mecanismo de patogenicidade para *C. fetus* e pode estar envolvida na afinidade tecidual de *C. fetus*.

### 3.4. Quimiotaxia

A quimiotaxia é o movimento das bactérias em direção ou para longe de um estímulo químico (ADLER, 1975). Esse fenômeno foi descoberto no final do século 19, por dois biólogos, Engelmann e Pfeffer, que observaram que as bactérias são capazes de se mover em direção as condições adequadas de oxigênio, minerais e nutrientes orgânicos. As bactérias possuem uma memória química rudimentar, controlada pela quimiotaxia, em que as células bacterianas respondem em questão de milissegundos as alterações nos níveis de substâncias quimioefetoras reconhecidas pelos receptores sensoriais (Adler, 1975, Korolik e Ketley, 2008).

A quimiotaxia bacteriana tem sido extensivamente estudada em *Escherichia coli*, que é considerada bactéria-modelo para explicar as vias de transdução do sinal quimiosensorial em outras bactérias (Figura 1). Com base no genoma que contém componentes da quimiotaxia e sua organização em *C. jejuni*, foi possível estabelecer um modelo básico de como *Campylobacter* spp. detectam e respondem a estímulos químicos (Korolik e Ketley, 2005). Com *C. fetus*, apenas um estudo pontual avaliou especificamente a quimiotaxia *in silico* da espécie (Fahmy et al., 2012).

Foi identificado no genoma de *C. fetus* subsp. *fetus* que os genes que codificam as proteínas citoplasmáticas transdutoras do sinal quimiotático e os receptores sensoriais bacterianos que detectam substâncias químicas no ambiente, os quimiorreceptores, apresentam elevado nível de similaridade com os identificados em *C. jejuni*, sugerindo uma estreita relação filogenética dos genes da quimiotaxia de *Campylobacteraceae* (Fahmy et al., 2012).

O estudo do genoma de *C. jejuni* (Parkhill et al., 2000; Marchant et al., 2002) revelou que a motilidade direcionada em *Campylobacter* spp., a quimiotaxia, é governada por um sistema universal de dois componentes, base reguladora dessa rede. Essa via de transdução do sinal quimiotático é composta por proteínas semelhantes aos transdutores transmembrânicos, *Tlp* (*transducer-like protein*), que são quimiorreceptores bacterianos e os produtos dos genes *che* (*chemotaxis*), as proteínas transdutoras do sinal quimiotático, *Che* (Korolik e Ketley, 2008).

Em geral, as vias de transdução do sinal quimiotático de bactérias possuem etapas básicas: a recepção do sinal por quimiorreceptores localizados na membrana da célula bacteriana; transdução de sinal para retransmitir os sinais de receptores de membrana para o motor flagelar e adaptação do sinal para dessensibilização do sinal inicial (Lux e Shi, 2004). Para tanto, faz-se necessário conhecer mais detalhadamente os quimiorreceptores, os *Tlp*, e as proteínas transdutoras de sinal da quimiotaxia, as proteínas *Che*, ambos essenciais no complexo quimiosensorial de bactérias.

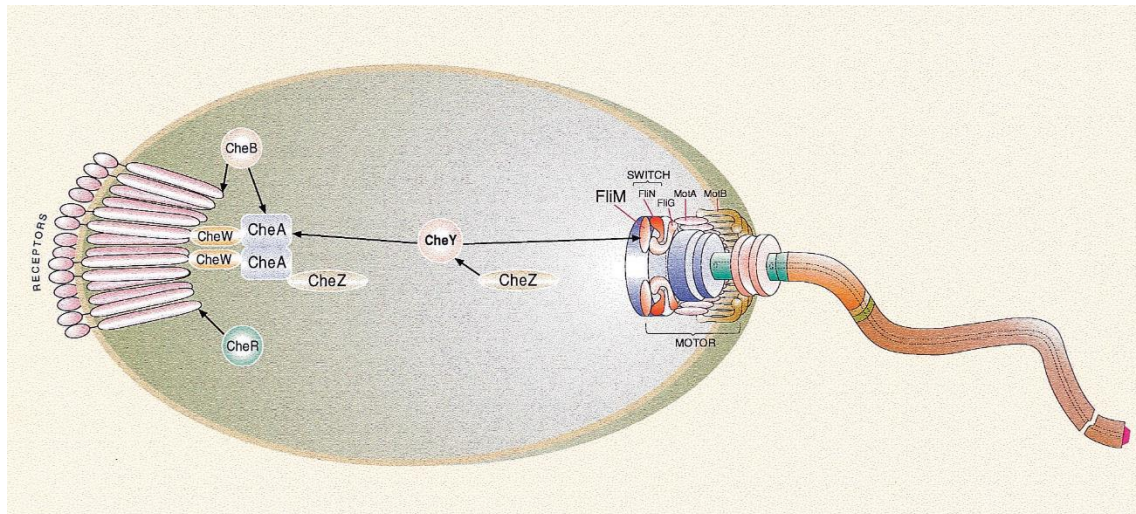


Figura 1 - Esquema simplificado de interações proteína-proteína durante a transdução do sinal quimiotático em bactérias. As setas pretas representam interações regulamentadas. O quimiorreceptor mostrado é um MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*). O esquema não está desenhado em escala. Fonte: Bren e Eisenbach, 2000.

### 3.4.1. Os quimiorreceptores

Os quimiorreceptores mais estudados de *Campylobacter* spp. são os de *C. jejuni*. *C. jejuni* codifica dez proteínas quimiorreceptoras (*Tlp*) e duas proteínas envolvidas em aerotaxia (*Aer*). Os *Tlp* são proteínas sensoriais transmembrânicas especializadas que permitem às bactérias detectar moléculas quimioefetoras no ambiente (Korolik, 2010). Os *Tlp* de *C. jejuni* são classificados a partir das características funcionais e estruturais em quatro grupos distintos: A, B, C e Aer (Marchant et al. 2002), sendo que cada grupo media respostas para um grupo específico de estímulo atraentes ou repelentes (Stock e Surette, 1996).

Em *C. fetus*, Fahmy et al. (2012) identificaram a partir de uma análise *in silico* que o genoma de *C. fetus* possui nove genes que codificam quimiorreceptores com alta similaridade com os genes de *Campylobacter* spp. *C. fetus* codifica oito proteínas quimiorreceptoras (*Tlp*) e uma proteína envolvida em aerotaxia (*Aer*). Os *Tlp* de *C. fetus* também são classificados a partir das características funcionais, estruturais e de similaridade em quatro grupos distintos: A, B, C e Aer (Fahmy et al. 2012).

Os quimiorreceptores do Grupo A são *Tlp1*, *Tlp3*, *Tlp4* e *Tlp7* e *TlpA* (Fahmy et al., 2012), possuem similaridade aos bem caracterizados MCP de *E. coli*. Esses receptores contêm três domínios – periplasmático, citoplasmático e transmembrânico – consistindo de proteínas quimiorreceptoras que atravessam a membrana (Falke et al., 1997). Em função de seu domínio extracelular, o grupo A de quimiorreceptores são os mais provavelmente responsáveis por sinalizar quimioefetores externos a bactéria (Korolik e Ketley, 2008).

O Grupo B de quimiorreceptores contém apenas um receptor sensorial, o *Tlp10* (Fahmy et al., 2012), que é uma proteína citoplasmática ancorada a membrana celular por uma única região transmembrânica terminal, que representa um sistema de taxia por energia, capaz de detectar piruvato e fumarato (Zautner et al., 2012).



Os quimiorreceptores do Grupo C, *Tlp6* e *Tlp8*, contêm apenas proteínas e domínios citoplasmáticos sendo aptos a detectar sinais citoplasmáticos (Fahmy et al., 2012), sugerindo que a detecção do estado fisiológico interno da célula bacteriana pode desempenhar um papel importante na quimiotaxia de *Campylobacter* spp. (Korolik e Ketley, 2005; Korolik e Ketley, 2008).

O receptor do Grupo *Aer*, *Aer2* ou *CetB*, participa na detecção redox e é importante na identificação da concentração adequada de oxigênio e na característica microaerofílica de *Campylobacter* spp. (Taylor et al., 1999). Em *C. fetus* não foram identificados os *Tlp2*, *Tlp5*, *Tlp9* ou *CetA* e *Aer1*, que estão presentes em *C. jejuni* (Fahmy et al., 2012).

Mutantes que perderam um ou mais dos quimiorreceptores ou apresentam alterações estruturais ou funcionais nos receptores demonstram redução na motilidade e quimiotaxia e conseqüentemente, redução na capacidade da bactéria de infectar o hospedeiro (Hendrixon e Dirita, 2001; Tareen et al., 2010; Zautner et al., 2012).

### 3.4.2. Proteínas *Che* e a via de transdução do sinal quimiotático

*C. fetus* possui sete genes *Che* (*Chemotaxis*), que codificam as proteínas citoplasmáticas da via de transdução do sinal quimiotático, *CheA*, *CheW*, *CheY*, *CheV*, *CheB*, *CheR* e *CheZ* (Fahmy et al., 2012). O núcleo central de transdução do sinal quimiotático é composto pelos quimiorreceptores, a histidina quinase *CheA*, o regulador de resposta *CheY*, e as proteínas acopladoras *CheW* e *CheV*. As proteínas *CheB*, *CheR* e *CheZ*, que são relacionadas a regulação da sinalização e adaptação, são consideradas proteínas acessórias (Wuichet e Zhulin, 2010; Lertsethtakarn et al., 2011).

A proteína *CheA* é uma histidina quinase que possui função de fosforilar *CheY* além de se autofosforilar, mediando a transferência do sinal do quimiorreceptor ao citoplasma da bactéria (Stock e Surret, 1996). *CheW* é a proteína adaptadora que se acopla a *CheA*. *CheY* é a proteína reguladora da resposta quimiotática, que atua no motor flagelar. A proteína *CheV* possui ação acopladora semelhante a *CheW*. *CheR* e *CheB* participam da adaptação do sinal quimiotático pela metilação e desmetilação dos quimiorreceptores, respectivamente (Korolik e Ketley, 2005; 2008; Lertsethtakarn et al., 2011). A proteína *CheZ* possui função estabelecida na quimiotaxia de *E. coli*, acelerando a autodesfosforilação intrínseca de *CheY*, removendo o sinal de *CheY-P* pela desfosforilação de *CheY*, porém o gene que codifica essa proteína não foi identificado no genoma de *C. jejuni* (Marchant et al., 2002).

O comportamento de natação (*swimming*) das bactérias depende das condições do ambiente. Em ambientes onde não há um gradiente químico (Figura 2A), as bactérias nadam com um padrão randômico, produzido pela alternância entre episódios de rotação no sentido anti-horário e horário. Em um gradiente atrativo ou repelente (Figura 2B), as bactérias monitoram alterações na concentração dos quimioefetores para elas migrarem e usam essa informação para modular a probabilidade do próximo evento de reorientação espacial, conhecidos como “tombos” (*tumble*). Essas respostas locomotoras prolongam a migração em direção à ambientes quimicamente favoráveis (Parkinson, 1993; Eisenbach, 2001).

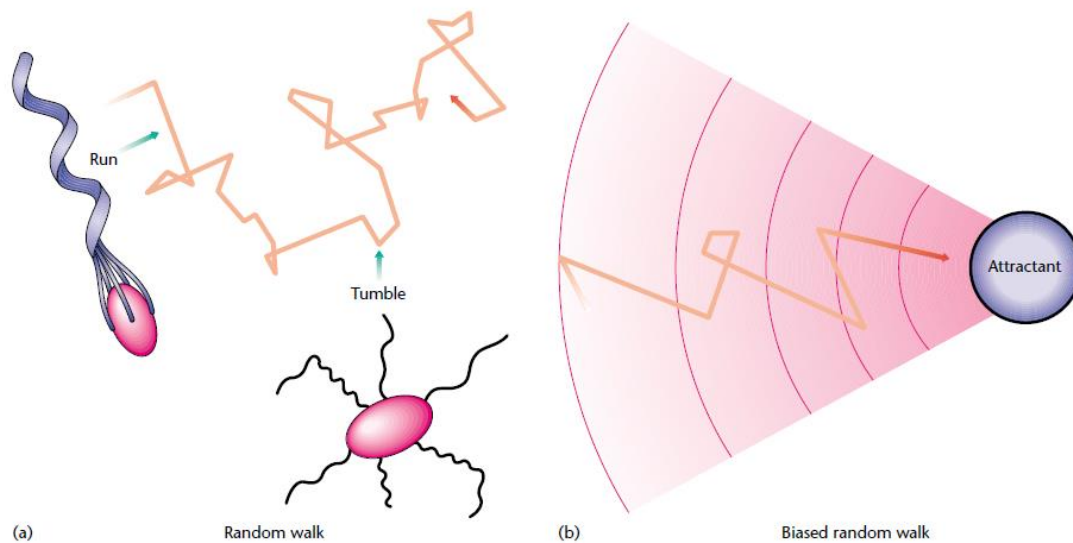


Figura 2 – Comportamento de natação das bactérias. (A) Movimento aleatório. (B) Movimento aleatório direcionado.

Fonte: Eisenbach, 2001.

A primeira etapa da via de transdução do sinal quimiotático é a ligação de uma molécula quimioefetora (substrato químico do ambiente) aos domínios acopladores dos quimiorreceptores da bactéria, os *Tlp* (Korolik e Ketley, 2005). Quando há ligação de uma molécula quimioatraente ao quimiorreceptor bacteriano, há uma mudança na conformação do receptor e esse sinal inibe a atividade da histidina quinase *CheA*. Nessa situação, *CheA* não se autofosforila, consequentemente não são gerados grupos fosfatos para serem transferidos para fosforilação de *CheY*, consequentemente, *CheY* na forma não fosforilada falha em interagir com motor flagelar. Assim, os flagelos permanecem girando no sentido anti-horário e a bactéria continua migrando para frente sem mudança de direção ao estímulo quimioatraente (Eisenbach, 2001; Korolik e Ketley, 2008).

No entanto, na ausência de uma molécula quimicamente atrativa ligada ao domínio periplasmático do quimiorreceptor bacteriano há uma mudança conformacional no quimiorreceptor bacteriano e emissão de um sinal (Falke e Hazelbauer, 2001). Esse sinal é transduzido a *CheA*, no complexo de ativação da histidina quinase *CheA*. A transdução do sinal é realizada a partir do acoplamento da proteína *CheW* ou de *CheW* e *CheV* (Gegner et al., 1992; Schuster et al., 1993; Lertsethtakarn et al., 2011). Após a autofosforilação da proteína *CheA*, forma-se um grupo fosfato que é transferido ao regulador de resposta, *CheY*. *CheY* em sua forma fosforilada (*CheY-P*) se liga as proteínas do motor flagelar, as proteínas *FliM*. A ligação em quantidade suficiente de *CheY-P* ao motor flagelar leva a inversão do sentido de rotação flagelar, passando do sentido anti-horário para o sentido horário, resultando na reorientação espacial da migração bacteriana (Bren e Eisenbach, 2001).

A rotação flagelar no sentido anti-horário (*default direction*) é associada ao estado de migração em linha reta, enquanto que a rotação flagelar no sentido horário é utilizada para reorientar a migração da bactéria, fenômeno conhecido como *tumbling* (Stock e Surette, 1996; Bren e Eisenbach, 2001). A bactéria responde a um quimioefetor pela alternância entre migração direta

e *tumbling*. As células bacterianas combinam uma rápida reorientação espacial e temporal no ambiente pelo *tumbling* com prolongados períodos de migração em direção a quimioatraentes ou para longe dos quimiorrepelentes (Eisenbach, 1996; Falke et al., 1997). A frequência de tumbling e migração direta é governada pelo sentido de rotação flagelar. A direção da rotação flagelar, sentido anti-horário ou horário, é influenciada pelo estado de fosforilação de CheY. A quantidade de CheY-P é regulada pela ligação da molécula quimioefetora ao quimiorreceptor da bactéria. (Stock e Surette, 1996; Eisenbach, 2004; Korolik e Ketley, 2008).

A adaptação do sistema é acompanhada pela variação no grau de metilação de resíduos específicos no domínio de sinalização citoplasmática do quimiorreceptor. Os grupos metil são transferidos aos quimiorreceptores por uma metiltransferase ativa constitutiva, *CheR*, que mantém a autofosforilação de *CheA* e transmite um sinal de sentido horário ao motor flagelar. Quando os grupos metil são removidos pela metilesterase *CheB*, ocorre uma inibição da autofosforilação de *CheA* e transmissão de um sinal de sentido anti-horário ao flagelo (Springer e Koshland, 1977; Yonekawa et al., 1983, Bren e Eisenbach, 2000). Além disso, *CheA* também pode passar o grupo fosfato para *CheV*, que por sua vez controla a atividade de *CheB*. O término do sinal quimiotático ocorre pela desfosforilação de *CheY*, mediada por *CheZ*, e do domínio regulador de resposta em *CheA* (Korolik e Ketley, 2005). A perda de qualquer uma das proteínas que atuam à jusante do receptores resulta em um fenótipo bacteriano não quimiotático, com reduzida capacidade de colonização do hospedeiro (Stock e Surette, 1996; Armitage, 1999).

Outro processo que é importante para a quimiotaxia bacteriana é a regulação da expressão gênica, onde pode haver uma repressão na expressão dos genes da quimiotaxia e consequentemente dos seus produtos, as proteínas quimiotáticas (Xu et al., 2003; Lewin, 2007; Stynen, 2009). Isso pode ocorrer em certas ocasiões no cultivo *in vitro* por exemplo, onde as bactérias estão em um ambiente biologicamente confortável, com condições favoráveis ao crescimento e sem desafios de colonização. Esse comportamento foi observado no estudo realizado por Cooper et al. (2013), que verificaram que a passagem *in vitro* de *C. jejuni* resultou em mundaças fenotípicas e perda de virulência da bactéria. Os autores relataram que após sucessivas passagens da bactéria *in vitro*, houve alteração nos genes da relacionados motilidade e nos genes *che*, que são os responsáveis pela síntese de proteínas quimiotáticas *Che*.

O contrário acontece *in vivo*, onde as bactérias precisam da motilidade e quimiotaxia para infectar e colonizar os tecidos do hospedeiro. Nessa situação, há indução na expressão dos genes da quimiotaxia e consequentemente um aumento na produção de proteínas quimiotáticas (Scott et al., 2007; Porter et al., 2011).

O aumento na expressão das proteínas quimiotáticas *CheW* e *Mcp* (*Methyl Accepting Chemotaxis*) foi observado por Stynen (2009), após passagem seriada de *C. fetus* subsp. *venerealis* (NCTC 10354 = ATCC 19438) em novilha virgem. Uma forma de restabelecer a virulência e a expressão de genes bacterianos, é a passagem da bactéria no hospedeiro, que aumenta a expressão das proteínas quimiotáticas e pode aumentar a capacidade bacteriana de colonizar a superfícies mucosas (Stynen, 2009).

### 3.4.3. O papel da quimiotaxia na colonização do hospedeiro e patogênese da infecção por *Campylobacter* spp.

A localização do ambiente ou nicho adequado para a colonização é um dos primeiros eventos que ocorrem durante a interação bactéria - hospedeiro, sendo uma importante etapa para o

estabelecimento da infecção. Nesse contexto, a quimiotaxia tem sido reconhecida como um importante fator para a afinidade tecidual, colonização e virulência de *Campylobacter* spp. (Hugdahl et al., 1998; Vegge et al., 2009).

Como pré-requisito para a infecção, *Campylobacter* spp. deve interagir com o hospedeiro e esse processo é mediado pelo sistema quimiotático do microrganismo que o guia até as células do hospedeiro local da infecção (Tareen et al., 2010). Pela quimiotaxia, as bactérias chegam aos nichos apropriados do hospedeiro que suportam o crescimento bacteriano ou se afastam dos microambientes prejudiciais para o microrganismo (Blair, 1995).

O papel da quimiotaxia na infecção por *Campylobacter* spp. foi dissecado usando mutantes *Che*, que não possuem transdução do sinal quimiotático, ou por mutantes que carecem de quimiorreceptores individuais (Lertsethtakarn et al., 2011). Mutantes não quimiotáticos (*Che*) de *C. jejuni* demonstraram reduzida ou completa incapacidade em colonizar tecidos do hospedeiro (Takata et al., 1992; Yao et al., 1997; Hendrixson e Dirita, 2004). Amostras de *C. jejuni* mutantes dos quimiorreceptores *Tlp3* e *Tlp9* (Golden e Acheson, 2002, Rahman et al., 2014), *Tlp4* (Vegge et al., 2009), *Tlp7* (Tarren et al., 2010), *CetA* e *CetB* (Hendrixson e Dirita, 2001) apresentam reduzida motilidade e deficiência em infectar células *in vitro*. A ausência dos *Tlp3* e *Tlp4* reduz significativamente a capacidade de *C. jejuni* colonizar a mucosa jejunal de camundongos (Li et al., 2014). Os quimiorreceptores *Tlp1*, *Tlp4* e *Tlp10* têm sido reconhecidos como importante para a colonização intestinal por *C. jejuni* em aves (Hendrixson e Dirita, 2004).

O estudo do comportamento quimiotático de *Campylobacter* spp. iniciou com Paster e Gibbons, (1986). Eles avaliaram diversos ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, íons inorgânicos, bile e mucina, no entanto somente o ácido fórmico e formato foram quimioatraentes para *Campylobacter concisus*. Os autores concluíram que o comportamento quimiotático específico de *C. concisus* por formato pode ter um papel essencial na colonização de superfícies orais, pois o formato é fator de crescimento para a bactéria e está presente na placa dental.

Em 1988, Hugdahl e colaboradores reportaram o comportamento quimiotático *in vitro* de *C. jejuni*. Os quimioatraentes para *C. jejuni* incluem alguns aminoácidos como serina, aspartato e glutamato, alguns ácidos orgânicos como piruvato, fumarato e succinato, e o açúcar fucose. A quimioatração de *C. jejuni* por esses substratos é um fator importante para a afinidade da bactéria pelo trato intestinal (Hugdahl et al., 1988; Hazeleger et al., 1998; Khanna et al., 2006; Vegge et al., 2009; Baserisalehi e Bahador, 2011; Burrough et al., 2012).

Apesar de existirem poucas informações sobre o papel da quimiotaxia na colonização do hospedeiro por *C. fetus*, o estudo realizado por Stynen (2009) sugere que a quimiotaxia pode ser importante para a virulência e colonização do hospedeiro por *C. fetus*. Nesse estudo, Stynen, (2009) observou um aumento significativo na expressão de proteínas relacionadas a quimiotaxia após a passagem seriada de *C. fetus* subsp. *venerealis* em novilha. A autora concluiu que a quimiotaxia pode ser importante no estabelecimento da infecção por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, pois permite a bactéria identificar condições ideais de crescimento no muco vaginal e no útero, encontrando sítios adequados de colonização da mucosa.

#### 3.4.4. Demonstração e mensuramento *in vitro* da quimiotaxia

Diferentes tipos de ensaios de quimiotaxia foram estabelecidos, a fim de pesquisar substâncias com atividade quimioefetora para microrganismos específicos (Miller et al., 2009). Pfeffer no

final do século 19 desenvolveu o primeiro método para avaliação *in vitro* da quimiotaxia, denominado de método capilar, em que se observa quimiotaxia bacteriana inserindo um capilar contendo uma solução química de teste em uma suspensão bacteriana e em seguida observa-se microscopicamente o acúmulo de bactérias no interior do capilar (quimiotaxia positiva) ou o movimento das bactérias para longe do capilar (quimiotaxia negativa).

Para quimiotaxia positiva este procedimento tem sido utilizado com sucesso para a quantificação de bactérias que se acumulam no interior do capilar contendo uma solução atrativa, enquanto que para a quimiotaxia negativa, o repelente no capilar diminui o número de bactérias que entram no capilar. Alternativamente, o repelente é colocado com a suspensão de bactérias mas não no capilar, o número de bactérias que migram para o interior do capilar como refúgio é então mensurada (Tso e Adler, 1974; Adler, 1975).

O ensaio capilar modificado por Adler (1973) tem sido amplamente utilizado para demonstrar o comportamento quimiotático em várias bactérias, no entanto, este procedimento não é adequado para o estudo de *Campylobacter* spp., em função da natureza microaerofílica do microrganismo e da necessidade de mudança de atmosfera para proporcionar condições adequadas à sobrevivência e motilidade do microrganismo (Hugdahl et al., 1988).

Para o estudo do comportamento quimiotático de *C. jejuni*, Hugdahl et al. (1988) modificaram e adaptaram o ensaio químico em tampão (*chemical-in-plug assay*) (Tso e Adler, 1974). O ensaio químico em tampão é um método semi-quantitativo, com base na alteração da opalescência ou transparência do ágar semisólido ao redor do quimioefetor em decorrência da concentração ou afastamento de células bacterianas, respectivamente (Hugdahl et al., 1988; Hazeleger et al., 1998). No entanto, o ensaio químico em tampão tem sido bastante criticado como método para avaliação da quimiotaxia, em função de seu potencial de gerar resultados falsos-positivos (Li et al., 2010; Kanungpean et al., 2011).

Em função disso, para se obter resultados mais confiáveis nos estudos de quimiotaxia de *Campylobacter* spp. tem sido recomendado utilizar o ensaio em placa pelo método do disco, onde as bactérias respondem a um gradiente químico criado pela difusão de um quimioefetor a partir um disco de papel filtro saturado colocado sobre o ágar semi-sólido (Khanna et al., 2006; Vegge et al., 2009; Baserisalehi e Bahador, 2011; Burrough et al., 2012). As bactérias migram e se acumulam em torno do disco se o químico é um atraente (químioatração) e se afastam, deixando uma zona transparente ao redor do disco, se é quimiorepelente (quimiorepulsão). A zona transparente é cercada por um anel de bactérias, o que indica que as bactérias se afastaram do disco e não morreram por um efeito tóxico do repelente. Alguns químicos não provocam resposta quimiotática e são classificados com inertes (Adler, 1975; Hugdahl et al., 1988).

O ensaio quimiotático em placa pelo método do disco é um método fácil, rápido e confiável para a determinação da quimiotaxia, uma vez que os resultados são conhecidos dentro de poucas horas (Hazeleger et al., 1998). O ensaio quimiotático em placa é o método mais recomendado e o mais utilizado atualmente para avaliar a quimiotaxia *Campylobacter* spp., em função de sua confiabilidade, rapidez e capacidade de fornecer um ambiente de microaerofilia para a bactéria.

### 3.5. O útero bovino gestante e infecção por *Campylobacter fetus*

Apesar do conhecimento sobre a CGB ter evoluído bastante nas últimas décadas, os processos envolvidos na afinidade tecidual e infecção do útero por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus*

subsp. *fetus* e consequente aborto são ainda pobremente entendidos (Vandeplasseche et al., 1963; Stoessel, 1982, Blaser et al., 2008). Sabe-se que o *C. fetus* subsp. *venerealis* move-se a partir da vagina para o útero ainda não gestante, bem como em qualquer momento da prenhez, porém não foi comprovado se a bactéria passa da vagina para o útero na metade da gestação interrompendo-a, ou o microrganismo permanece todo o tempo na cavidade uterina, para produzir o aborto (Vandeplasseche et al., 1963; Stoessel, 1982).

A patogenia do aborto em bovinos e ovinos pela infecção por *C. fetus* subsp. *fetus*, segundo Wassenaar e Newell (2006), envolve a translocação do intestino, penetração na corrente sanguínea e bacteremia que leva o microrganismo ao útero quando este estiver prenhe, infectando a placenta e o feto. Os trabalhos de Graham (2002) e Baker e Graham (2010) sugerem que o *C. fetus* subsp. *fetus* transpõe o epitélio intestinal através das vias transcelular e paracelular. O microrganismo infecta os placentomas, causa inflamação dos cotilédones e placentite que culminam, com o abortamento (Garcia e Brooks, 1993). Apesar da epidemiologia e de aspectos patogênicos serem bem distintos, os achados patológicos dos abortamentos em bovinos causados por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* são iguais, pois possuem as mesmas características histopatológicas nas membranas fetais, consistindo de áreas focais de placentite necrosante supurativa e vasculite caracterizada por degeneração fibrinoide da parede dos vasos com infiltrado neutrofílico e necrose (Hum, 1987).

Os abortos decorrentes da infecção por *C. fetus* podem ocorrer durante todo o período de gestação, porém, as perdas gestacionais se concentram no segundo terço de gestação da vaca (4° ao 6° mês gestacional) (Stoessel, 1982; Hum, 1987; Garcia e Brooks, 1993), possivelmente em função de fatores teciduais e hormonais do útero gestante bovino que atuam como quimioatraentes para a bactéria.

Lowrie e Pearce (1970) observaram que a taxa de crescimento do *C. fetus* foi significativamente maior na presença de extratos dos tecidos placentários, comparada a extratos de outros tecidos, como fígado, rim, baço e músculo. Os autores sugerem que o tropismo do *C. fetus* pelos tecidos placentários é dependente de nutrientes locais. A especificidade tecidual ou tropismo tecidual é um fenômeno reconhecidamente importante em doenças microbianas (Keppie et al., 1965; Smith, 1968).

A presença de substâncias no trato reprodutivo da fêmea bovina que podem ser utilizadas como substrato para o crescimento bacteriano foi reportada por Olds e Vandemark (1957). Gibbons (1959) reportou que os fluidos do trato genital da vaca contêm uma série de substâncias, entre elas aminoácidos, como aspartato, glutamato e serina, alguns ácidos orgânicos como piruvato, íons inorgânicos como ferro e vários carboidratos, entre eles fucose. Os estudos de Alexander (1957), Zemjanis e Hoyt (1960) e Smibert (1963) demonstraram que os aminoácidos, ácidos orgânicos e íons inorgânicos específicos, como o ferro e o carboidrato fucose, estimularam significativamente o crescimento *in vitro* de *C. fetus*.

Os aminoácidos e os ácidos orgânicos são as principais fontes de carbono para *Campylobacter* spp. e o ferro é um nutriente essencial e importante fator para colonização (Parkhill et al., 2000; Wooldridge e van Vliet, 2005; Lee e Newell, 2006). Além de serem fatores de crescimento e as principais fontes de carbono para espécies de *Campylobacter*, estudos tem demonstrado que os aminoácidos aspartato, serina, glutamato e os ácidos orgânicos fumarato, piruvato e succinato são substâncias quimiotáticas para *C. jejuni* e importante para afinidade tecidual e colonização do

hospedeiro (Hugdahl et al., 1988, Hazeleger et al., 1998; Khanna et al., 2006, Vegge et al., 2009, Baserisalehi e Bahador, 2011).

Considerando que *Campylobacter* spp. não oxidam nem fermentam a maioria dos carboidratos, a utilização do açúcar fucose como fonte de carbono fornece a bactéria uma vantagem competitiva para colonização em ambientes adversos nutricionalmente (Stahl et al., 2011). A fucose, um dos principais componentes da mucina, também tem sido reconhecida como fator quimiotático para *C. jejuni* e importante para a afinidade tecidual e colonização (Hugdahl et al., 1988, Burrough et al., 2012). Assim, substratos presentes no lúmen uterino da vaca podem servir também como fatores quimioatrativos, favorecendo e direcionando a localização tecidual *in vivo* de *C. fetus*.

A base nutricional para a especificidade e tropismo de *Brucella abortus* pela placenta bovina foi observada por Smith et al. (1961) e Keppie et al. (1965). O eritritol, um açúcar presente em grande quantidade nos tecidos placentários e fluidos fetais da vaca, é considerado o fator nutricional e quimiotático para a localização tecidual de *B. abortus* (Smith et al., 1961; Keppie et al., 1965; Sangari et al., 2000). A possibilidade do eritritol funcionar como fator de crescimento para *C. fetus* foi sugerida por Herzberg (1966), porém os estudos de Lowrie e Pearce (1970) e Walsh et al., (1973) demonstraram que o eritritol não estimulou o crescimento *in vitro* de *C. fetus*. No entanto, esses estudos não avaliaram o eritritol como substância quimioatraente para *C. fetus*, não podendo assim excluir a participação do eritritol no tropismo do *C. fetus* pelo útero bovino gestante.

Além das funções estruturais e nutricionais, que são essenciais para o desenvolvimento do feto, a placenta da vaca e da ovelha possuem uma importante função endócrina (Hoffman e Schuler, 2002). A placenta da vaca e da ovelha possuem um grupo de células especializadas na produção de hormônios, as células trofoblásticas, que compõem o epitélio trofodermal e delimitam externamente o corioalantoide embrionário. As células trofoblásticas da placenta sintetizam os hormônios (Igwebuike, 2006) estradiol (Matamoros et al., 1994), progesterona (Reimers et al., 1985) e lactogênio placentário (Wooding et al., 1996), sendo que a produção e concentração desses hormônios nos fluidos e tecidos variam bastante durante a gestação (Nguyen et al., 2012).

Os estrógenos regulam o fluxo de sangue uterino, perfusão e crescimento do miométrio, bem como a síntese de actomiosina que aumenta a força das contrações uterinas no momento da expulsão fetal (Boos et al., 2006). Os estrógenos, em conjunto com a relaxina, promovem o amolecimento do colo do útero e relaxamento do canal do parto e estimulam a liberação da prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) do endométrio (Kindahl et al., 2004). A placenta é a principal fonte de estrógenos durante a prenhez na vaca (Hoffmann et al., 1976; Schuler et al., 2008). Os estrógenos são detectados em tecidos cotiledonares e carunculares por volta do quarto mês de gestação (Tsumagari et al., 1993). A síntese de estrógenos aumenta na metade da gestação, sendo que as concentrações maiores são encontradas no trimestre final de gestação da vaca (Inaba et al., 1983; Conley et al., 1992).

A progesterona inibe a ovulação mantendo o hormônio luteinizante (LH) em baixos níveis preparando o endométrio para a implantação e mantendo quiescente o miométrio para o desenvolvimento bem-sucedido do embrião (Goff, 2004). Nesse contexto, ressalta – se a importância de dois tecidos, o corpo lúteo e placenta, que assumem a responsabilidade endócrina pela síntese de progesterona em períodos distintos da gestação. No início da gestação o corpo lúteo é a principal fonte de progesterona, no entanto já ao 150° - 180° dia de gestação há uma involução tecidual e redução na capacidade das células luteais em sintetizar esse hormônio

(Shemesh et al., 1984; Reimers et al., 1985; La Paz et al., 2007). Em contrapartida, já por volta do 90º dia de gestacional, em função do processo de maturação das células binucleadas trofoblásticas, a placenta já possui grande capacidade de sintetizar progesterona (Izhar et al., 1992) e se torna a principal fonte extraovariana de progesterona durante a gestação da vaca (Pimentel et al., 1986; Schuler et al., 2008; Nguyen et al., 2012).

O lactogênio placentário, produzido pela placenta da vaca e da ovelha, é um hormônio estruturalmente relacionado à prolactina e ao hormônio do crescimento (Gertler e Djiane, 2002). O lactogênio placentário possui atividade biológica lactogênica, somatogênica e na mamogênese (Byatt et al., 1992). A produção do lactogênio placentário aumenta conforme o avanço do período gestacional, elevando a concentração hormonal na circulação materna, atingindo o platô no terço final de gestação (Byatt et al., 1992; Wooding, 1992).

Os hormônios estrógeno e progesterona, tem sido estudado quanto ao seu papel na regulação da resposta imune as infecções bacterianas, virulência e estabelecimento da infecção. Os hormônios estrógeno e progesterona atuam na modulação da resposta imune frente a infecções bacterianas do trato genital, sendo que durante a fase estrogênica a resposta imune a bactérias é mais efetiva quando comparada a resposta imune durante a fase progesterônica do ciclo estral, que é a fase mais susceptível a infecções por bactérias (Lewis et al., 2003; García-Gómez et al., 2013).

Além do seu papel na modulação do sistema imunine, os hormônios esteroidais, estrógeno e progesterona, tem um efeito direto sobre o metabolismo e crescimento bacteriano, e a expressão de fatores de virulência. Os hormônios esteroidais são envolvidos no controle de transcrição de vários genes, sendo importante para a virulência bacteriana e estabelecimento da infecção. A progesterona, por exemplo, possui um efeito direto sobre o metabolismo, crescimento e expressão dos fatores de virulência de determinadas bactérias que infectam o trato genital (García - Gómez et al., 2013).

A progesterona é fator de crescimento para *Brucella abortus* (Hanifa Moursi, 1965; Misra et al., 1976), aumenta a sobrevivência e multiplicação de *Neisseria gonorrhoeae* durante a infecção de células epiteliais cervicais humanas (Edwards, 2010), aumenta a patogenicidade de *Mycoplasma* spp. (Furr e Taylor-Robinson, 1993) e em *Chlamydia trachomatis*, a exposição a progesterona provoca uma mudança significativa no perfil dos genes que são expressos, provocando um aumento na virulência do microrganismo (Amirshahi et al., 2011).

Em algumas espécies de *Camylobacter*, estradiol e progesterona têm sido estudado como fator de crescimento e fator quimiotático. Para uma amostra hipervirulenta de *C. jejuni* responsável por abortamento em ovinos, os hormônios estrógeno e progesterona não foram fator de crescimento nem fator quimiotático (Burrough et al., 2012). Já para *C. rectus*, um patógeno associado com doença periodontal em seres humanos, estradiol e progesterona demonstraram ser fator de crescimento (Yokoyama et al., 2005).

Em *C. fetus*, estrógeno e progesterona foram estudados somente como fator de crescimento *in vitro*, não existindo trabalhos sobre o potencial desses hormônios estereoidais e do hormônio lactogênio placentário como fator quimiotático para a bactéria.

O potencial de estradiol e progesterona como fator de crescimento *in vitro* para *C. fetus* ainda são indefinidos. Zemjanis e Hoyt (1960) mostraram que a adição do estradiol na concentração de 0,005 % estimulou o crescimento *in vitro* de *C. fetus*, enquanto que concentrações entre 0,01 % -



0,2 % inibiram o crescimento da bactéria. Já Walsh et al. (1973) observaram que a adição de estradiol nas concentrações de 0,01 % a 0,0005 % ao meio de cultivo não estimulou nem inibiu o crescimento do microrganismo.

Osborne e Bourdeau, (1955) observaram que a adição de progesterona ao meio de cultivo líquido estimulou significativamente o crescimento de uma amostra de *C. fetus* isolado de bovino, no entanto Walsh et al., (1973) reportaram que a progesterona não foi fator de crescimento para *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Diversos fatores podem ter influenciado os resultados desses estudos, entre eles, a metodologia empregada, a concentração e solubilidade dos hormônios no meio de cultivo, o tempo de avaliação e a origem das amostras. No estudo de Walsh et al., (1973) foi avaliada uma amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis*, enquanto que nas pesquisas de Osborne e Bourdeau (1955) e Zemjanis e Hoyt (1960) foram utilizados *C. fetus* isolados de bovinos sem descrição da subespécie, podendo assim ser *C. fetus* subsp. *venerealis* ou *C. fetus* subsp. *fetus*.

É importante ressaltar que os estudos realizados avaliaram substâncias presentes no útero gestante da vaca como fatores de crescimento *in vitro*, porém não foram realizados estudos com essas substâncias como fatores quimiotáticos responsáveis pela localização tecidual de *C. fetus*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostras

Nesse estudo foram utilizadas seis amostras de *Campylobacter fetus* de diferentes origens (Tabela 1), sendo duas amostras de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e quatro amostras de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

A amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 é uma amostra que foi isolada após três passagens seriadas em novilha virgem. Brevemente, a amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354<sup>T</sup> = ATCC 19438<sup>T</sup> foi inoculada em novilha virgem e, após sete dias de infecção, foi isolada do muco cérvico-vaginal desse animal a amostra denominada P1 (Cottorello, 2006). Subsequentemente, a amostra P1 foi inoculada na vagina de outra novilha virgem e, após nove dias de infecção a novilha foi sacrificada e foi isolada do útero desse animal a amostra denominada P2. Da inoculação da amostra P2 em outra novilha virgem, foi possível o isolamento, a partir do muco cérvico-vaginal, 14 dias pós-infecção, da amostra P3 (Stynen, 2009).

### 4.2. Condições de cultivo das amostras

As amostras foram cultivadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck, Alemanha) com 1,5 % de ágar (Himedia, Índia) suplementado com 10% de sangue desfibrinado de equino e mantidas a 37°C em microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, e 80% N<sub>2</sub>) por 36 horas. A pureza das amostras foi avaliada pela coloração com fucsina fenicada e microscopia óptica em imersão com aumento de 1000x.

**Tabela 1- Amostras de *Campylobacter fetus* utilizadas nesse estudo.**

Amostras	<i>Campylobacter fetus</i> subsp.	Origem	Referência
ATCC 19438	<i>Venerealis</i>	muco cérvico-vaginal bovino	Lawson e MacKinnon, 1952
P3*	<i>Venerealis</i>	muco cérvico-vaginal bovino	Stynen, 2009
ATCC 27374	<i>Fetus</i>	cérebro de feto ovino abortado	Vinzent e Alloy, 1952
EV-5	<i>Fetus</i>	feto bovino abortado	Leite, 1977
Gaúcho	<i>Fetus</i>	lavado prepucial bovino	Stynen et al., 2003
Grécia	<i>Fetus</i>	muco cérvico-vaginal bovino	Stynen et al., 2003

ATCC - *American Type Culture Collection*

\* P3 - é uma amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* (NCTC 10354<sup>T</sup> = ATCC 19438<sup>T</sup>) que foi isolada após três passagens seriadas em novilha virgem (Stynen, 2009).

Os isolados de *C. fetus* foram previamente identificados fenotípica e molecularmente por técnicas de rotina (Debruyne et al., 2008; Hum et al., 1997) e mantidas a -80°C em caldo tioglicolato acrescido de 20% de glicerol, até a realização dos experimentos.

### 4.3. Substâncias químicas e discos

Foram utilizadas nesse estudo aminoácidos, ácidos orgânicos, íons inorgânicos, carboidratos e hormônios em diferentes concentrações (Tabela 2). As concentrações dessas substâncias foram definidas a partir de estudos anteriores sobre o crescimento e quimiotaxia de *Campylobacter* spp. e por serem as concentrações fisiológicas encontradas no útero bovino gestante (Rakes et al., 1958; Melampy et al., 1959; Walsh et al., 1973; Byatt et al., 1987; Hugdahl et al., 1988; Hazeleger et al., 1998; Burrough et al., 2012). Todas as substâncias foram esterilizadas por filtração em filtro de 0.22µm e após foram realizadas diluições seriadas na base 10 até atingirem as concentrações a serem testadas.

**Tabela 2– Substâncias químicas e concentrações testadas nos ensaios quimiotáticos para *C. fetus***

Substância	Concentrações testadas	Diluyente	Origem
<b>Ácidos orgânicos</b>			
Fumarato (sal sódico)	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Sigma-Aldrich <sup>1</sup>
Piruvato (sal sódico)	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Sigma-Aldrich
Succínato (sal sódico)	0.005, 0.05 e 0.5M	PBS	Sigma-Aldrich
<b>Aminoácidos</b>			
L-Aspartato	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Sigma-Aldrich
L-Glutamato	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Sigma-Aldrich
L-Serina	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Sigma-Aldrich
<b>Carboidrato</b>			
Meso-Eritritol	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Sigma-Aldrich
<b>Íon inorgânico</b>			
Sulfato de Ferro ferroso	0.01, 0.1 e 1M	PBS	Merck <sup>2</sup>
<b>Hormônios</b>			
17β – Estradiol	0,05, 0,5, 5,0 e 50ng/mL	DMSO:PBS <sup>4</sup>	Sigma-Aldrich
Lactogênio placentário bovino	0,05, 0,5, 5,0 e 50ng/mL	H <sub>2</sub> O <sup>5</sup>	Sigma-Aldrich
Progesterona	0,05, 0,5, 5,0, 50 e 500ng/mL	DMSO:PBS	ProspecBio <sup>3</sup> Sigma-Aldrich
<b>Controles</b>			
Deoxicolato (quimiorepelente)	0.1M	PBS	Merck
L-Fucose (quimioatraente)	0.1M	PBS	Sigma-Aldrich
PBS pH 7.0 (inerte)	0.01M	-	-

1 - Sigma-aldrich, EUA, 2 – Merck, Alemanha; 3 – ProspecBio, EUA; 4 - DMSO: PBS (1:4), Dimethyl sulfoxide; phosphate-buffered saline; 5 – Água ultrapura.

Um dia antes da realização do ensaio quimiotático, os discos de papel estéreis (Laborclin, Brasil), com 6 mm de diâmetro foram distribuídos sobre placas de Petri estéreis e adsorvidos com 50 µL de cada substância, nas concentrações a serem testadas. Após a completa secagem, os discos foram armazenados em frascos de vidro estéreis, protegidos da luz e acondicionados entre 2°C e 8°C até a realização dos ensaios.

#### 4.4. Suspensão bacteriana

Confirmada a pureza da amostra, o crescimento bacteriano de 36 h de cultivo foi colhido com um suabe estéril e as bactérias suspensas em PBS pH 7.0 estéril. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente (OD 600<sub>nm</sub>) para a absorbância de 1.8 (aproximadamente 4 x 10<sup>9</sup> UFC/mL). Retrospectivamente, a confirmação da contagem de bactérias viáveis no ensaio quimiotático foi realizada em placa de ágar BHI com 5% de sangue desfibrinado de equino, em duplicata, pelo *drop count method* (Miles e Misra, 1938).

#### 4.5. Ensaio quimiotático em placa para *C. fetus*

O ensaio quimiotático em placa para *C. fetus* foi realizado conforme as metodologias descritas por Hugdahl et al., (1988) e Vegge et al., (2009). Brevemente, o volume de 6 mL da suspensão bacteriana com absorbância de 1.8 em 600<sub>nm</sub> foram adicionados a 6 mL de uma solução estéril de PBS pH 7.0 com 0.8% de ágar à 45°C e em seguida homogeneizada com leves movimentos circulares (Figuras 3A e 3B). Os 12 mL dessa suspensão bacteriana (aproximadamente 2x10<sup>9</sup> UFC/mL) em PBS-ágar 0.4% foram distribuídos em uma placa de Petri (90x15mm) (Figura 1C), mantida por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, com auxílio de uma pinça lisa estéril foram distribuídos de forma circular sobre a suspensão de bactéria - ágar discos de papel adsorvidos com a substância a ser testada (até cinco discos por placa) (Figura 3D). As placas do ensaio quimiotático foram então incubadas a 37°C em microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, e 80% N<sub>2</sub>) por 4 horas.

Discos com PBS (0.01M, pH 7.0), L-fucose (0.1M) e deoxicolato de sódio (0.1M) foram utilizados como controles não quimiotático, quimioatraente e quimiorepelente, respectivamente, em todos os experimentos. Os ensaios quimiotáticos foram realizados em duplicata para cada concentração da substância testada.

#### 4.6. Leitura e interpretação do ensaio quimiotático em placa

No ensaio quimiotático em placa, as bactérias respondem a um gradiente químico criado pela difusão de um quimioefetor a partir um disco saturado colocado sobre o ágar semi-sólido. As bactérias migram e se acumulam em torno do disco se o químico é um atraente e se afastam, deixando uma zona transparente ao redor do disco, se é quimiorepelente. A zona transparente é cercada por um anel de bactérias, o que indica que as bactérias se afastaram do disco e não morreram por um efeito tóxico do repelente. Alguns químicos não provocam resposta quimiotática e são classificados com inertes.

A atividade quimiotática foi visualizada sob luz indireta (Hugdahl et al., 1988; Vegge et al., 2009). O diâmetro (Ø) do acúmulo ou afastamento bacteriano foi mensurado, sendo o resultado registrado e expresso em milímetros (mm) (Figura 3E). As zonas de acumulação bacteriana em torno do disco (Figura 3F – QA) foram consideradas como resposta quimiotática positiva, sendo as substâncias testadas classificadas como quimioatraente. As zonas de afastamento bacteriano

do disco (Figura 3F – QR) foram consideradas como resposta quimiotática negativa, sendo as substâncias classificadas como quimiorrepelente. Quando não houve alteração da concentração bacteriana, ou seja, não houve acúmulo nem afastamento bacteriano ao redor do disco (Figura 3F – IN), a substância foi classificada como não quimiotática. A atividade quimiotática foi fotodocumentada com luz branca no sistema de captura de imagem L-Pix Ex (Loccus Biotecnologia, Brasil).

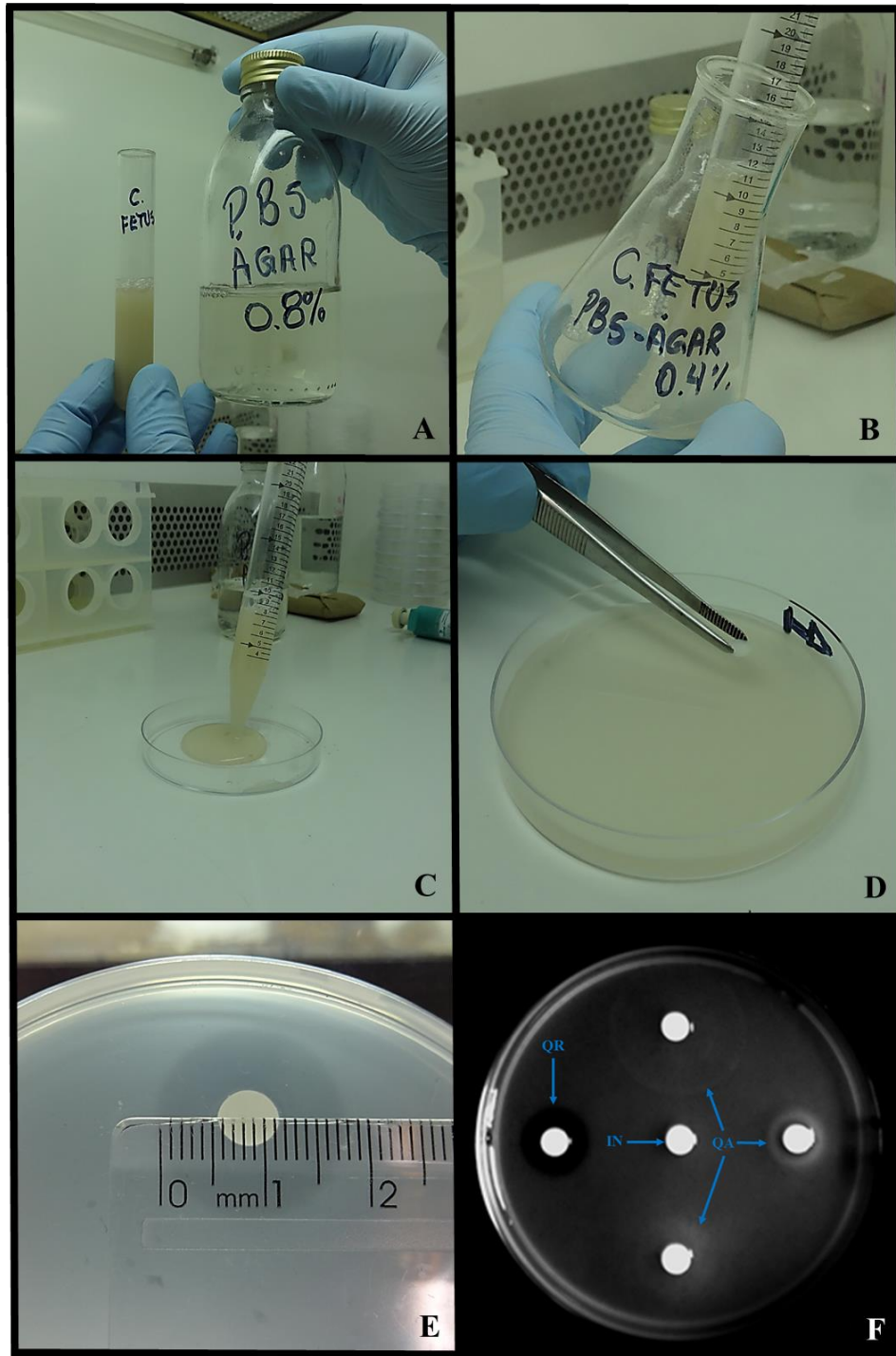


Figura 3 - Ensaio quimiotático em placa para *C. fetus*. (A) Suspensão de *Campylobacter fetus* com absorvância de 1.8 ( $OD_{600nm}$ ) e solução de PBS-Ágar 0.8% à 45°C; (B) Suspensão de *Campylobacter fetus* com absorvância de 1.8 ( $OD_{600nm}$ ) (6 mL) adicionados a PBS-Ágar 0.8% (6 mL) à 45°C; (C) Distribuição da suspensão bacteriana-PBS-Ágar 0.4% em uma placa de Petri de 90x15 mm; (D) Distribuição de disco adicionado com substância a ser testada sobre a suspensão de bactéria-PBS-Ágar 0.4%; (E) Leitura e interpretação da atividade quimiotática, setas QA- zona de acúmulo de bactérias (quimioatração), seta QR – zona de afastamento de bactérias (quimiorrepulsão), seta IN – zona sem acúmulo e sem repulsão de bactérias (não quimiotático); (F) Quantificação da atividade quimiotática.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quimiotaxia tem sido reconhecida como um fator importante para a virulência e colonização do hospedeiro por espécies de *Campylobacter*, como *C. concisus*, *C. jejuni* e *C. rectus* (Korolik e Konkel, 2005) e que também pode ser um importante fator para a virulência e afinidade do *C. fetus* pelo útero bovino gestante.

O presente trabalho reporta o primeiro estudo de quimiotaxia de *C. fetus* por substâncias do útero bovino gestante e pode ajudar a elucidar o tropismo da bactéria pelo útero bovino durante a gestação. L-fucose, sulfato de ferro ferroso, fumarato, piruvato, succinato, L-aspartato, L-glutamato e L-serina foram quimioatraentes para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Progesterona foi quimioatraente nas maiores concentrações testadas, 50 ng/mL e 500 ng/mL, para algumas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*. Meso-eritritol, 17 $\beta$ -estradiol e lactogênio placentário não apresentaram atividade quimiotática e deoxicolato foi quimiorepelente.

A quimiotaxia de *C. fetus* por substâncias do útero bovino gestante foi determinada pelo ensaio quimiotático em placa pelo método do disco, onde se monitorou a migração bacteriana em direção ou para longe das substâncias químicas. Os resultados médios (duplicatas) da resposta quimiotática de *C. fetus* por essas substâncias químicas em diferentes concentrações são expressos em milímetros (mm) de diâmetro ( $\emptyset$ ) de acúmulo ou repulsão bacteriana. Os resultados da contagem de bactérias viáveis (UFC/mL) nas suspensões (Suspensão 1-12) de *C. fetus* são apresentados na Figura 4, onde podemos observar que durante o estudo as diferentes suspensões apresentaram um perfil similar de quantidade de células bacterianas viáveis.

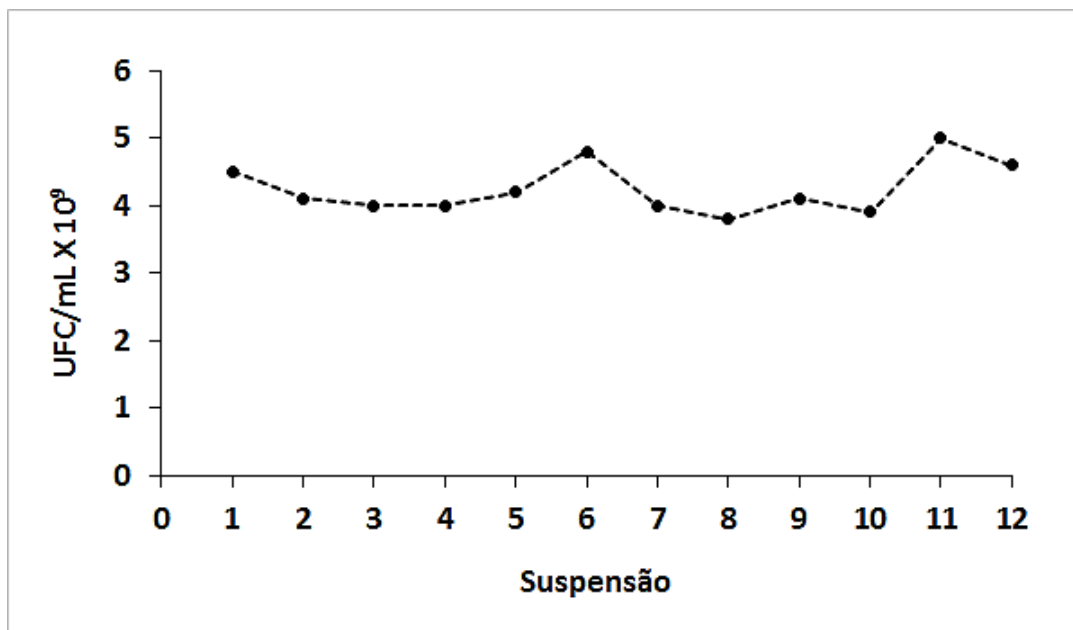


Figura 4 – Contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) nas suspensões de *C. fetus* utilizadas como inóculo nos ensaios de quimiotaxia.

Em função da inexistência de dados sobre a quimiotaxia de *C. fetus*, a escolha das substâncias químicas que foram utilizadas como controles foi baseada nos dados de quimiotaxia de *C. jejuni* reportada por Hugdahl et al. (1988) e em resultados de um pré - experimento realizado com amostras de *C. fetus* (dados não apresentados). L - fucose 0.1M que foi utilizada controle quimioatraente, deoxicolato de sódio 0.1 M como controle quimiorrepelente e PBS 0.01M como controle não quimiotático/inerte apresentaram as respostas quimiotáticas esperadas para todas as amostras de *C. fetus* (Figura 5).

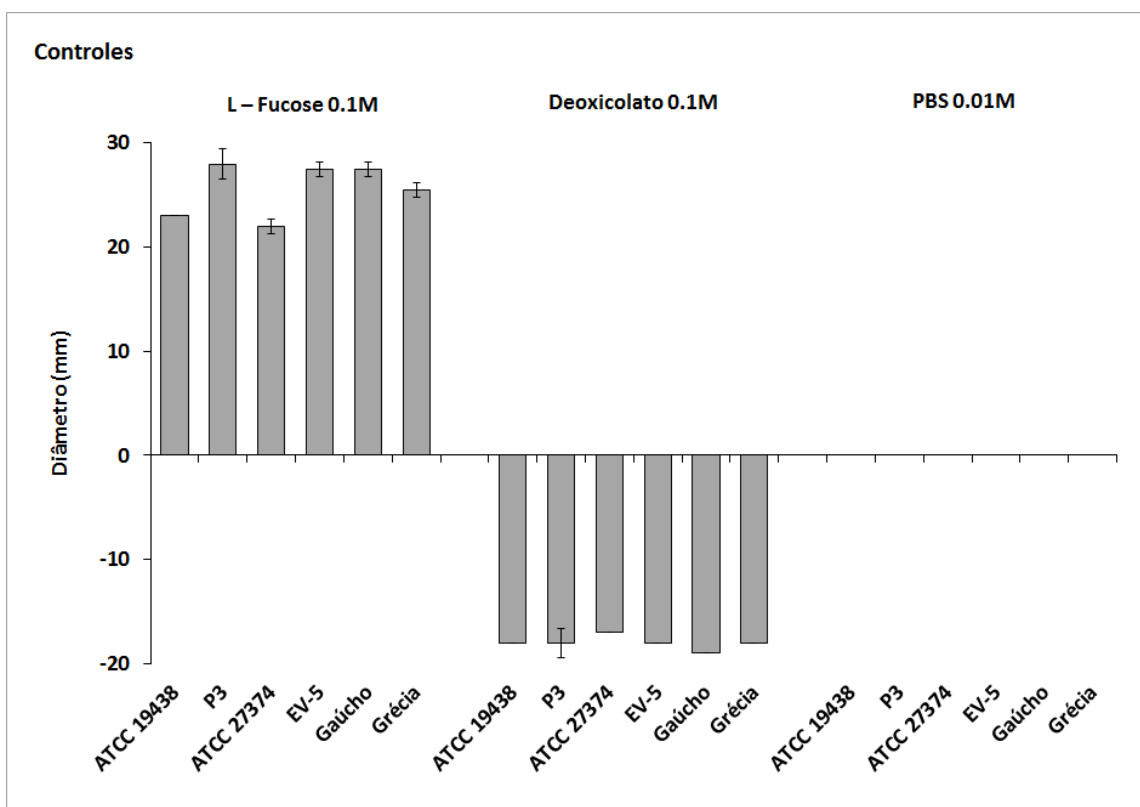


Figura 5 – Quimiotaxia de *C. fetus* por deoxicolato de sódio 0.1M (controle quimiorrepelente), L – fucose 0.1M (controle quimioatraente) e PBS 0.01M pH 7.0 (controle não quimiotático/inerte). Valores em milímetros (mm) de diâmetro de acúmulo ou repulsão bacteriana. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. As barras de erro mostram os desvios-padrão.

Deoxicolato de sódio foi a única substância dentre as testadas com atividade quimiorrepelente para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*. Esse resultado assemelha-se com os resultados de estudos de quimiotaxia para *C. jejuni* (Hugdahl et al., 1988; Khanna et al., 2006; Vegge et al., 2009; Burrough et al., 2012) onde o deoxicolato de sódio é detectado pelos quimiorreceptores *Tlp3* e *Tlp4* (Li et al., 2014) e também se mostra quimiorrepelente. Considerando que *C. fetus* possui genes que codificam os *Tlp3* e *Tlp4* (Fahmy et al., 2012) é provável que esses dois quimiorreceptores também sejam os responsáveis por detectar o deoxicolato de sódio e a determinar a quimiorrepulsão da bactéria por essa substância química.

*C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* foram quimioatraídos por L – Fucose, um componente da mucina e presente na superfície das células epiteliais, que pode ajudar a bactéria a colonizar o muco e aderir à superfície mucosa do trato genital da vaca.



L – fucose é um açúcar monossacarídeo componente dos glicanos ligados O – N, produzidos por células epiteliais e é o principal componente da mucina (Becker e Lowe, 2003). Os glicanos que contêm fucose ou glicanos fucolisados estão presentes nas superfícies de células epiteliais, são conhecidos por atuarem como alvos de aderência para *C. jejuni* (Cinco et al., 1984; Ruiz-Palacios et al., 2003; Day et al., 2009) e podem também ser importantes para aderência de *C. fetus* ao trato genital da vaca. L - fucose é o único carboidrato que atua como fator de crescimento para *Campylobacter* spp. (Muraoka e Zhang, 2011; Stahl et al., 2011), logo, a utilização da L – fucose como fonte de carbono por *Campylobacter* spp. fornece à bactéria vantagens para colonização em ambientes desafiantes e adversos nutricionalmente (Stahl et al., 2011), o que pode ocorrer no trato genital da vaca durante a infecção pelo *C. fetus*.

Considerando que a fucose é dos principais constituintes do muco uterino bovino (Gibbons, 1959), a quimiotaxia por fucose pode ajudar *C. fetus* a identificar os locais mais favoráveis no muco uterino para a colonização. A quimiotaxia de *C. jejuni* por fucose tem sido relacionada ao tropismo fetoplacentário dessa espécie pela placenta do cobaio (Hugdahl et al., 1988; Burrough et al., 2012). Os nossos resultados indicam que isso também pode explicar o tropismo do *C. fetus* pelos tecidos placentários, pois a bactéria foi quimiotraída por L – fucose, uma substância presente na placenta vaca (Munson et al., 1989; Jones et al., 1994; 1997). Nós concluímos que além de ser potencial fator de crescimento e proporcionar vantagens competitivas e metabólicas para a bactéria, a quimiotaxia por fucose pode ajudar na colonização muco uterino bovino e participar na identificação dos resíduos de fucose para adesão as células epiteliais uterinas, bem como pode ser um dos fatores determinantes da afinidade do *C. fetus* pela placenta bovina.

Os ácidos orgânicos avaliados nesse estudo, fumarato, piruvato e succinato foram quimioatraentes para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* (Figura 6).

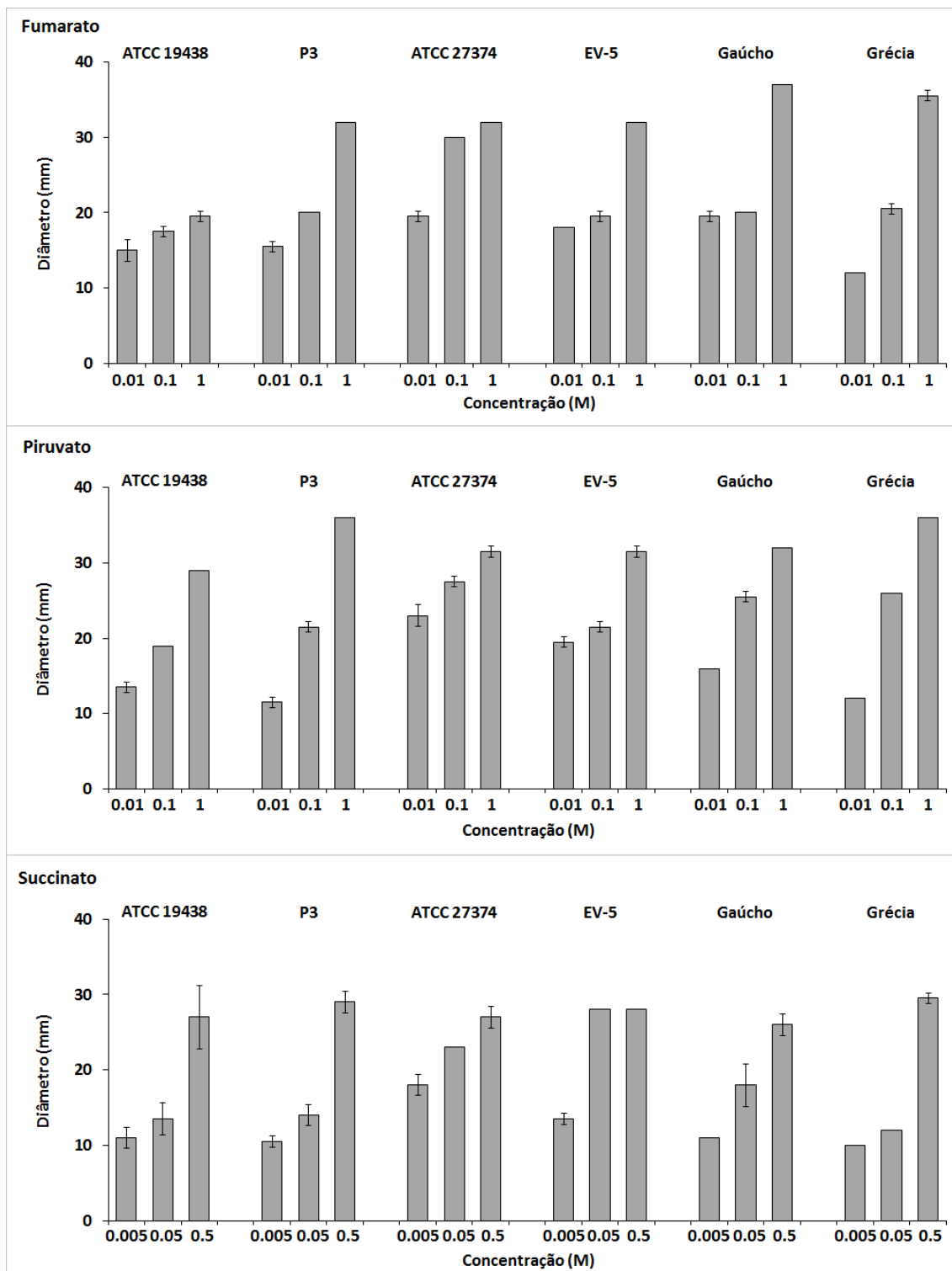


Figura 6 – Quimiotaxia de *C. fetus* por fumarato, piruvato e succinato em diferentes concentrações (M). Valores em milímetros (mm) de diâmetro de acúmulo ou repulsão bacteriana. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. As barras de erro mostram os desvios-padrão.

A quimioatração de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* por fumarato, piruvato e succinato, é um indicativo que essas substâncias químicas podem ser importantes para o metabolismo e ciclo de vida da espécie no hospedeiro. Em função da sua natureza assacarolítica, a quimiotaxia por ácidos orgânicos assume grande importância para a patogenicidade de *C. fetus*, pois ela pode ajudar a bactéria na navegação ambiental em busca de fontes de carbono para produção de energia como piruvato, doadores e receptor de elétrons como succinato e fumarato respectivamente e além disso, identificação dos locais adequados no muco para a colonização.

A partir das enzimas fumarato redutase, que converte o fumarato a succinato, fumarato hidratase, que catalisa a hidratação/dehidratação do fumarato ao ácido orgânico malato, succinato – COA ligase, succinil – COA  $\beta$  – sintetase e succinato desidrogenase que participam da oxidação do succinato e de um eficiente sistema de transporte de ácidos orgânicos, *C. fetus* consegue operar um ciclo dos ácidos tricarbóxicos completo e utilizar essas substâncias químicas para o transporte de elétrons, cadeia respiratória e como fontes de carbono para seu crescimento (Smibert, 1978; Blaser et al., 2008). A taxia por essas importantes fontes de energia é bom indicativo que existe uma ligação entre taxia e metabolismo e sugere que *in vivo* a quimiotaxia pode direcionar a migração da bactéria a um ambiente específico que suporte o crescimento bacteriano, como o útero bovino.

Os quimiorreceptores que participam da taxia por energia em *Campylobacter* spp., *CetB* que é capaz de detectar fumarato e piruvato (Zautner et al., 2012) e o *Tlp3*, que é um quimiorreceptor hábil a detectar várias substâncias químicas, entre elas o succinato (Rahman et al., 2014), provavelmente permitiram ao *C. fetus* ser quimioatraído por fumarato, piruvato e succinato. Sendo que o fumarato, piruvato e succinato estão presentes no muco uterino bovino (Gibbons, 1959), a quimioatração de *C. fetus* por esses ácidos orgânicos podem ajudar na navegação ambiental da bactéria no hospedeiro em busca dessas fontes de energia e identificação dos locais adequados no muco uterino para a colonização.

Os aminoácidos L - aspartato, L – glutamato e L – serina foram quimioatraentes para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* (Figura 7). Esses resultados são semelhantes ao encontrados nos estudos na quimioataxia de *C. jejuni* (Hugdahl et al., 1988; Khanna et al., 2006; Vegge et al., 2009; Baserisalehi e Bahador, 2011), sugerindo que os aminoácidos exercem importante função no metabolismo energético e ciclo de vida de *Campylobacter fetus*.

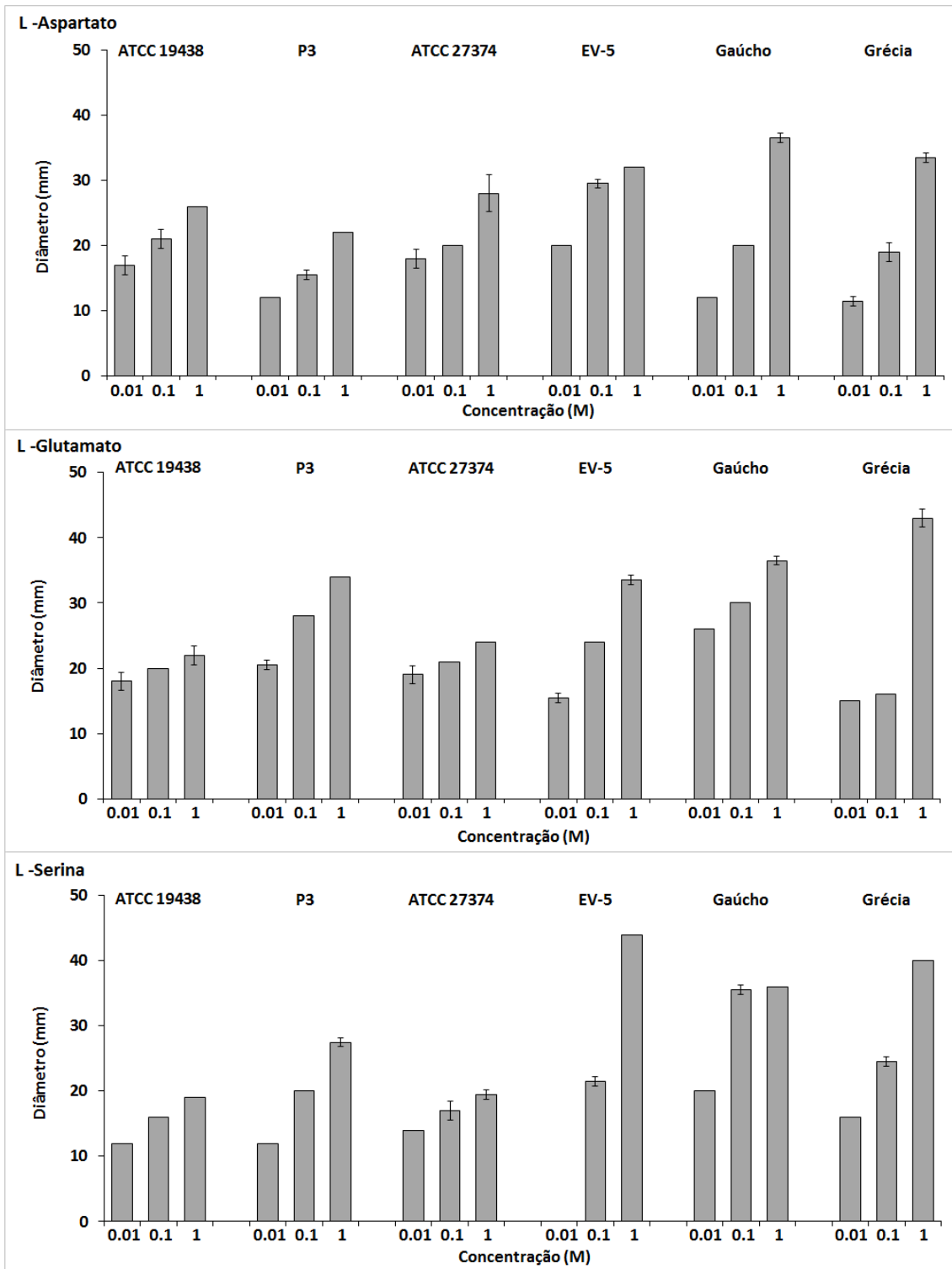


Figura 7 – Quimiotaxia de *C. fetus* por L - aspartato, L – glutamato e L – serina em diferentes concentrações (M). Valores em milímetros (mm) de diâmetro de acúmulo ou repulsão bacteriana. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. As barras de erro mostram os desvios-padrão.

A quimiotaxia por aminoácidos é importante para virulência de *Campylobacter* spp. (Vegge et al., 2009) e os nossos dados mostram que pode ser importante para a virulência de *C. fetus in vivo*, pois os aminoácidos são as principais fontes de carbono e de energia para *C. fetus in vivo* e, portanto, essenciais à sobrevivência da bactéria no hospedeiro. A quimiotaxia de *C. fetus* por L – asparatato pode ser explicada pela presença do *Tlp1*, que nos estudos de quimiotaxia de *C. jejuni* tem demonstrado ser um quimiorreceptor específico para detectar L – asparatato (Hartley-Tassell et al. 2007).

Como as informações sobre os quimiorreceptores de *C. fetus* são escassas e além disso não conhecemos a especificidade desses receptores, é possível que a bactéria possua um quimiorreceptor específico ou mesmo um quimiorreceptor multi – ligante para detectar os outros aminoácidos identificados como quimioatraentes em nosso estudo, L – glutamato e L – serina. A quimioatração por aminoácidos tem sido considerada importante mecanismo de taxia por energia, navegação ambiental e afinidade tecidual para a colonização de espécies de *Campylobacter* (Vegge et al., 2009).

Assim, nós concluímos que a quimioatração do *C. fetus* por L-asparato, L-glutamato e L-serina, aminoácidos encontrados no muco uterino bovino (Hugentobler et al., 2010), podem ser um importante fator para afinidade tecidual da bactéria e ajudar na invasão e colonização do útero da vaca.

O sulfato de ferro ferroso foi quimioatraente para as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* testadas (Figura 8). Esses resultados diferem dos observados para *C. jejuni*, em que o ferro ferroso não apresentou atividade quimiotática para duas amostras isoladas de aves (Hugdahl et al., 1998), para a amostra de referência NCTC 11168 e uma amostra hipervirulenta (IA3902) isolada de um surto de aborto em ovinos no EUA (Burrough et al., 2012). Isso salienta ainda mais a quimioatração do *C. fetus* por sulfato de ferro ferroso observada em nosso estudo e pode indicar a grande importância dessa substância química na virulência de *C. fetus*.

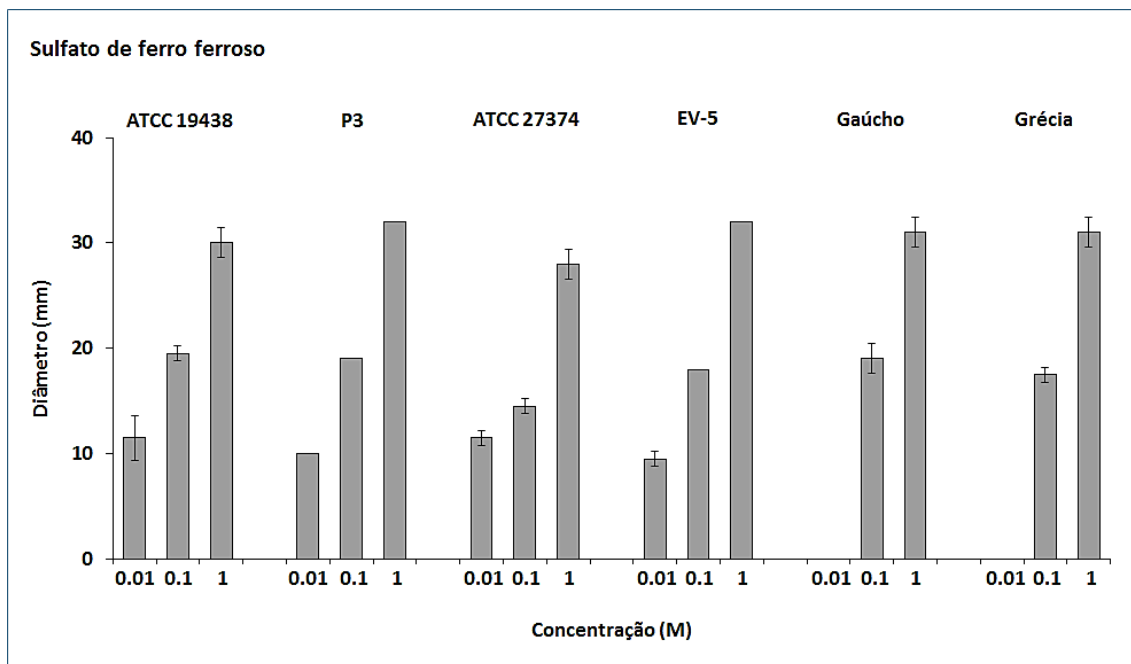


Figura 8 – Quimiotaxia de *C. fetus* por sulfato de ferro ferroso em diferentes concentrações (M). Valores em milímetros (mm) de diâmetro de acúmulo ou repulsão bacteriana. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. As barras de erro mostram os desvios-padrão.

*Campylobacter* spp. utilizam a quimiotaxia para identificar e migrar em direção a ambientes quimicamente favoráveis e que possuam preferencialmente grandes quantidades de nutrientes essenciais para o seu ciclo vida. Um desses nutrientes essenciais ao metabolismo e a patogênese da infecção por *Campylobacter* é o ferro. Nossos dados mostram que houve uma maior quimioatração da bactéria nas maiores concentrações ferro ferroso, indicando que as maiores concentrações ferro são as mais benéficas para a bactéria e podem ser fundamentais à virulência do microrganismo e ter um importante papel durante o curso da infecção.

Metabolicamente isso faz sentido, pois o crescimento de *Campylobacter* é maior na presença de grandes quantidades de ferro quando comparado à ambientes com restrição de ferro, onde o crescimento é significativamente reduzido. Assim, as altas quantidades de ferro nos tecidos placentários da vaca podem ser um potente quimioatraente para a bactéria. Uma vez identificado o gradiente favorável de ferro, a bactéria precisa dispor de mecanismos de transporte de ferro ferroso. Nesse sentido, *C. fetus* dispõe de dois sistemas de captação e transporte ferro ferroso, o sistema ABC, que permite a bactéria transportar o ferro ferroso do meio extracelular para dentro da bactéria (Moolhuijzen et al., 2009) e o sistema *feoAB*, que necessita apenas da proteína transportadora da membrana interna, a proteína *Feo*, para captar ferro ferroso e transportá-lo por difusão através das porinas da membrana externa para o periplasma (Naykare et al., 2006; Blaser et al., 2008; Miller, 2008).

A partir desses mecanismos de captação e transporte, o *C. fetus* pode utilizar o ferro na forma livre bem como extrair o ferro na forma complexado dos fluidos e tecidos do hospedeiro para a realização de processo celulares essenciais, crescimento e colonização. Nós acreditamos que a quimioatração de *C. fetus* por sulfato de ferro ferroso, um importante fator de crescimento (Zemjanis e Hoyt, 1960; Smibert, 1963) presente em altas quantidades na placenta bovina,

especificamente na região do trofoblasto (Will et al., 2010) pode ser um fator determinante para a bactéria colonizar esse nicho em particular e causar o aborto.

O meso – eritritol não apresentou resposta quimiotática para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* em nenhuma das concentrações testadas no presente estudo. O eritritol é um açúcar presente em altas concentrações nos fluidos fetais e na placenta da vaca e é conhecido por ser a base nutricional e quimiotática do tropismo placentário de *B. abortus* desde 1961 (Smith et al., 1961; Keppie et al., 1965, Sangari et al., 2000). Em 1970, Lowrie e Pearce, hipotetizaram que a presença do eritritol na placenta poderia determinar a localização tecidual e suportar o crescimento de *C. fetus*. Os autores avaliaram o eritritol como fator de crescimento para *C. fetus*, porém, ao contrário do que esperavam, o eritritol não estimulou o crescimento da bactéria. Posteriormente, Walsh et al. (1973), obtiveram esse mesmo resultado e, portanto, confirmando que o eritritol não é um fator de crescimento para *C. fetus*.

Com o objetivo de compreender o comportamento quimiotático e a afinidade tecidual de *C. fetus*, nós avaliamos o potencial quimioatraente do meso - eritritol para *C. fetus*. Os nossos resultados mostram que todas as concentrações de eritritol testadas foram quimiotaticamente inertes para *C. fetus* e esse comportamento pode ser relacionado a aspectos fenotípicos e genômicos do microrganismo. *C. fetus* é conhecido por ser uma bactéria que não metaboliza carboidratos, exceto o açúcar fucose (Muraoka e Zhang, 2011), não possui em seu genoma um operon *ery* (genes *eryA*, *eryB*, *eryC* e *eryD*) regulador do metabolismo e transporte do eritritol e isso pode explicar a inércia da bactéria à presença do meso – eritritol. A ausência de estímulo ao crescimento de *C. fetus* pelo eritritol reportada em estudos anteriores e o comportamento não quimiotático de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus* na presença de meso – eritritol observado no presente estudo sugerem que essa substância química não está envolvida na afinidade tecidual da bactéria pelo útero e placenta da vaca.

Os hormônios  $17\beta$  – estradiol foi não quimiotático em todas as concentrações testadas para as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*. O estradiol é um hormônio esteroide sintetizado pelas células trofoblásticas da placenta (Matamoros et al., 1994), detectável a partir do 33º dia de gestação (Hoffmann e Schuler, 2002) e que aumenta gradualmente com o avanço do tempo gestacional, atingindo altas concentrações no trimestre final de gestação da vaca (50 ng/g de tecido placentário) (Inaba et al., 1983; Tsumagari et al., 1993). Em função disso, nós esperávamos que o estradiol seria quimioatraente para *C. fetus* e assim, estar envolvido na invasão do útero da vaca e nos abortos que ocorrem no segundo e terceiro trimestres gestacionais, no entanto nossos resultados não mostram isso.

Em nosso estudo, avaliamos as diferentes concentrações do  $17\beta$  – estradiol encontradas na placenta bovina e que representam as diferentes fases da gestação vaca. No entanto nenhuma dessas concentrações foram quimiotáticas para *C. fetus*, sugerindo que o  $17\beta$  – estradiol não é um fator importante para o comportamento quimiotático de *C. fetus* e além disso, provavelmente não é fundamental para a afinidade da bactéria pela placenta bovina e patogenia do aborto. A inércia de *Campylobacter* sp. por  $17\beta$  – estradiol também foi observada por Burrough et al. (2012) ao avaliarem uma amostra de referência de *C. jejuni* (NCTC 11168) e uma amostra de *C. jejuni* hipervirulenta (IA3902) reponsável por surtos de aborto em ovinos no EUA.

O lactogênio placentário bovino, foi não quimiotático em todas as concentrações testadas para as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*. O lactogênio placentário, é um importante hormônio peptídico produzido pelas células trofoblásticas da placenta (Bolander e

Fellows, 1976; Wooding, 1982) e por ser produzido exclusivamente durante a gestação e especificamente pela placenta, essa substância química foi avaliada em seu potencial quimiotático para *C. fetus*. As concentrações testadas em nosso estudo foram similares as encontradas nos fluidos fetais e tecidos placentários durante as diferentes fases gestação da fêmea bovina (Byatt et al., 1987; Holland et al., 1997; Hossner et al., 1997), porém nenhuma delas demonstrou ser quimiotática para *C. fetus*, ou seja, a bactéria foi inerte na presença desse hormônio no ensaio em placa. Isso sugere que, *in vivo* o lactogênio placentário provavelmente não está relacionado com a afinidade do *C. fetus* pelos tecidos fetais e placentários da fêmea bovina.

Progesterona nas maiores concentrações testadas, 50 ng/mL e 500 ng/mL, foi quimioatraente somente para duas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*, Grécia e Gaúcho (Figura 9). Esses resultados diferem dos observados para as demais amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*, ATCC 27374<sup>T</sup> e EV - 5, bem como para amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC 19438<sup>T</sup> e P3, que não demonstraram resposta quimiotática por nenhuma das concentrações testadas de progesterona.

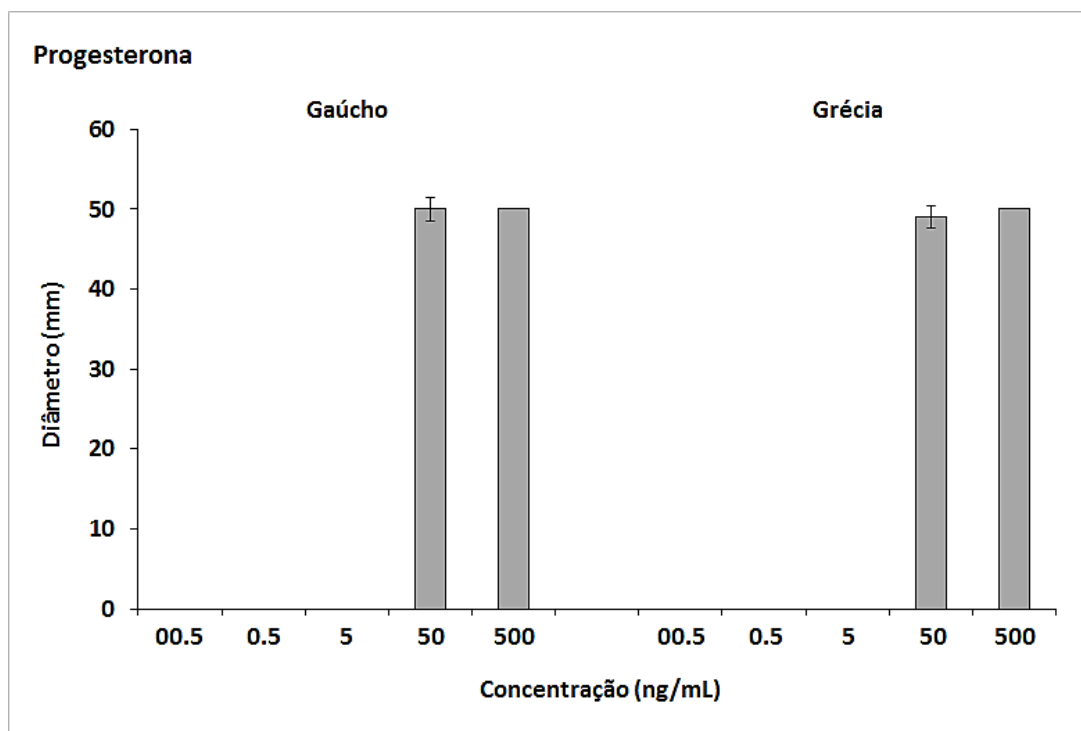


Figura 9 – Quimiotaxia das amostras Gaúcho e Grécia de *C. fetus* subsp. *fetus* por progesterona em diferentes concentrações (ng/mL). Valores em milímetros (mm) de diâmetro de acúmulo ou repulsão bacteriana. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes. As barras de erro mostram os desvios-padrão.

Nós temos um particular interesse no potencial quimioatraente de progesterona para *C. fetus*, pois o aumento na síntese placentária de progesterona no segundo trimestre da gestação da vaca pode ajudar a explicar a ocorrência de abortos nesse período e a afinidade tecidual da bactéria. Os nossos resultados mostram que *C. fetus* subsp. *venerealis* foi inerte na presença de progesterona enquanto que *C. fetus* subsp. *fetus* foi quimioatraído por progesterona somente em altas concentrações (acima de 50 ng/mL). Esse dado mostra que existe uma interessante diferença no



comportamento quimiotático entre *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* e isso pode estar relacionado ao mecanismo que cada subespécie utiliza para invadir o útero e causar o aborto.

*C. fetus* subsp. *fetus* possui marcado tropismo por tecidos feto-placentários, a bactéria consegue translocar o intestino, causar bacteremia e invadir somente o útero gestante, enquanto que *C. fetus* subsp. *venerealis* é um patógeno restrito ao trato genital, não causa bacteremia, invade o útero gestante, porém também pode invadir o útero ainda não gestante. Em função disso, nós hipotetizamos que *in vivo*, *C. fetus* subsp. *fetus* é quimiotaticamente hábil a migrar em direção ao útero quando houver uma alta quantidade de progesterona placentária, o que ocorre no segundo trimestre gestacional e explica a ocorrência do abortamento geralmente no 5º mês de gestação.

Já *C. fetus* subsp. *venerealis* invade o útero não em função da presença da progesterona e sim quando o microrganismo consegue sobrepujar o sistema imune do hospedeiro. Essa teoria concorda com os estudos de Schurig et al. (1974) e Corbeil et al. (1975), que observaram que *C. fetus* subsp. *venerealis* consegue invadir útero quando existem poucos neutrófilos e a resposta neutrofílica está reduzida, o que permite à bactéria escapar da fagocitose, invadir e colonizar o tecido.

A quimiotaxia bacteriana por progesterona é um processo ainda pouco conhecido, no entanto, baseado em nossos dados, é possível dizer que *C. fetus* subsp. *fetus* possui um quimiorreceptor específico ou multiligante capaz de detectar progesterona, ativar a via de transdução do sinal quimiotático e direcionar a motilidade bacteriana. A presença de um quimiorreceptor específico capaz de detectar hormônios esteroidais, entre eles progesterona, foi descrita em *Comamonas testoreroni*, bactéria que apresenta quimiotaxia por progesterona e utiliza esse hormônio como fonte de carbono e energia (Göhler et al., 2008; Liu et al., 2013).

A quimioatração das amostras Gaúcho e Grécia por progesterona somente nas maiores concentrações testadas, 50 ng/mL e 500 ng/mL, indica que existe um limite de detecção para a substância química e quando a concentração é identificada como favorável, *C. fetus* subsp. *fetus* migram em sua direção. Nós acreditamos que esse comportamento pode ter um importante papel na invasão do útero por *C. fetus* subsp. *fetus* e assim explicar a ocorrência dos abortos no 5º mês de gestação, pois nesse período a placenta apresenta altas concentrações de progesterona (cerca de 50 ng/g nos cotilédones e até 200 ng/g na placenta intercotiledonária) (Rakes 1958; Melampy et al., 1959; Inaba et al., 1983; Pimentel et al., 1986; Conley e Ford, 1987; Tsumagari et al., 1994; Schuler et al., 1999).

A concentração de progesterona aumenta consideravelmente durante o decorrer da gestação na vaca, especialmente no trato reprodutivo. A concentração sérica de progesterona atinge um valor máximo de 10 - 15 ng/mL durante a gestação (Stabenfeldt et al., 1970; Nguyen et al., 2012), enquanto que a concentração no útero pode atingir valores até 20 vezes superiores. A síntese de progesterona pela placenta bovina é baixa no primeiro trimestre gestacional (até 5 ng/g de tecido), no entanto há um aumento de 10 vezes (50 ng/g de tecido) no segundo trimestre de gestação (Izhar et al., 1992; Shemesh et al., 1992). Essa capacidade da placenta bovina em sintetizar progesterona aumenta significativamente a partir do 90º - 120ª dia de gestação em função da maturação das células trofoblásticas (Shemesh et al., 1984; Izhar et al., 1992) e conseqüentemente, as concentrações nos tecidos placentários sobem consideravelmente dentro do quinto e sexto mês de gestação.

Considerando que o *C. fetus* subsp. *fetus* naturalmente habita o intestino bovino e possui um marcado tropismo feto – placentário, é possível que a partir da detecção de um gradiente quimicamente favorável, por quimiotaxia a bactéria possa translocar o epitélio intestinal, causar bacteremia e invadir o útero gestante, infectando o feto e tecidos placentários, culminando em aborto.

Essa quimioatração de *C. fetus* subsp. *fetus* por progesterona somente em altas concentrações, sugere que a bactéria pode ser atraída ao útero bovino gestante quando o órgão possui grandes quantidades do hormônio. Além disso, a quimioatração do *C. fetus* subsp. *fetus* por uma substância química que não se encontra em seu habitat natural, o intestino, pode ser indicativo de um mecanismo de patogenicidade e um importante fator de virulência para essa subespécie, podendo estar relacionado a invasão do útero gestante e ao tropismo placentário.

Mecanismos de patogenicidade relacionados a progesterona tem sido descrito em outros patógenos reprodutivos. Em *N. gonorrhoeae* (Miller e Morse, 1977) e *Pseudomonas aeruginosa* (Mosier et al., 1991) foram identificadas uma proteína de ligação à progesterona e um sistema de transporte que permitem a essas bactérias metabolizar a progesterona e utiliza-la como substrato. Além disso, a progesterona aumenta infectividade e persistência de *N. gonorrhoeae* durante a infecção de células epiteliais cervicais humanas (Edwards, 2010), aumenta a patogenicidade de *Mycoplasma* spp. (Furr e Taylor-Robinson, 1993), regula positivamente genes que codificam o metabolismo dos aminoácidos em *C. trachomatis* (Amirshahi et al., 2011) e é fator de crescimento para *Brucella abortus* (Hanifa Moursi, 1965; Misra et al., 1976). Em *Prevotella* spp., a progesterona atua como fonte de energia, substituindo a vitamina K como transportador de elétrons durante a respiração bacteriana (Kornman e Loesche et al., 1982).

Em espécies de *Campylobacter*, a progesterona é fator de crescimento para *C. rectus* (Yokoyama et al., 2005) e *C. fetus* (Osborne e Bourdeau, 1955), no entanto o mecanismo que suporta o crescimento da bactéria ainda não é conhecido. Um mecanismo de patogenicidade associado a progesterona em *C. fetus* subsp. *fetus* pode proporcionar várias vantagens a bactéria, entre elas: atuar como fonte de carbono e energia, aumentando sua capacidade de crescimento e colonização, atuar como um substituto da vitamina K durante a transferência de elétrons e respiração bacteriana, trazendo benefícios como adaptação as condições com limitação de nutrientes e de baixa tensão de oxigênio, regular genes que codificam elementos de vias metabólicas importantes, como metabolismo energético e regular a expressão de genes associados a virulência, aumentando a aderência e infectividade em células do hospedeiro.

A diferença quimiotática entre as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* por progesterona pode ser em função do tempo de cultivo das amostras em laboratório. As amostras Grécia e Gaúcho, que foram quimioatraídas por progesterona em altas concentrações (acima de 50 ng/mL), são as amostras com o menor tempo de cultivo laboratorial, isoladas em 2001, comparado com as amostras *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374<sup>T</sup> e EV-5, isoladas em 1952 e 1974, respectivamente.

A adaptação ao cultivo laboratorial pode ter atenuado a virulência das amostras ATCC 27374<sup>T</sup> e EV-5, a partir da diminuição da expressão de proteínas quimiotáticas ou dos quimiorreceptores bacterianos, o que pode diminuir a capacidade das amostras responderem ao gradiente químico do ensaio e, portanto, alterar o perfil de resposta quimiotática. As amostras Grécia e Gaúcho, em função do menor tempo de cultivo laboratorial, podem ter sofrido pouca ou nenhuma alteração na via de transdução do sinal quimiotático, o que permitiu que elas respondem quimiotaticamente somente nas altas concentrações de progesterona. Essa hipótese corrobora com os resultados da

quimiotaxia por sulfato de ferro ferroso, onde as amostras Grécia e Gaúcho não demonstram resposta quimiotática na menor concentração avaliada (0.01M), indicando que essas amostras ainda não estão adaptadas às condições de cultivo laboratorial.

Nós esperávamos que amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 poderia apresentar um perfil quimiotático diferente da amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC 19438<sup>T</sup> que há anos é cultivada em laboratório, no entanto, nossos dados mostram que as amostras P3 e a amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC 19438<sup>T</sup> apresentaram perfil quimiotático similar para as substâncias que foram testadas no presente estudo. É possível que amostra P3 já se readaptou às condições de cultivo laboratoriais e diminui a expressão de proteínas quimiotáticas para níveis semelhantes aos da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC 19438<sup>T</sup>.

A regulação da expressão gênica é um processo extremamente dinâmico em procariotos, onde a célula bacteriana pode induzir ou reprimir a expressão dos genes, conforme as necessidades metabólicas e adaptação as condições ambientais (Stintzi, 2003; Lewin, 2007) e essa hipótese corrobora com os resultados de outros estudos (Woodall et al., 2005; Scott et al., 2007; Gripp et al., 2011; Cooper et al., 2013) que tem observado que em condições de cultivo *in vitro*, há uma repressão na expressão gênica e consequente redução na expressão de proteínas quimiotáticas. A rápida adaptação de *Campylobacter* spp. a condições ambientais foi reportada por Gaynor et al. (2004) que destacaram a notável capacidade de bactéria evoluir rapidamente em nível genético e fenotípico, como resultado das condições de armazenagem, cultura e de passagens. Além da repressão na expressão das proteínas *Che*, é possível que o cultivo *in vitro* tenha reprimido a expressão de quimiorreceptores individuais, os *Tlp*, como tem sido descrito em outros estudos com *Campylobacter* spp. (Day et al., 2012; King et al., 2013).

O ensaio quimiotático em placa pelo método do disco mostrou ser uma técnica fácil, rápida e confiável para determinar a quimiotaxia de *C. fetus*. Os resultados expressos em milímetros de diâmetro de acumulação bacteriana mostram que os diâmetros das zonas de quimioatração foram dependentes da concentração testada, onde os maiores diâmetros foram correlacionados com maior concentração da substância testada. As diferenças na resposta quimiotática entre substâncias podem ser atribuídas as diferentes taxas de difusão de cada substância no ágar, pois cada substância química possui características únicas, como a sua composição química e solubilidade. Sendo assim, nós não podemos comparar o potencial quimiotático entre substâncias químicas diferentes. Já a diferença na resposta quimiotática entre amostras é decorrente da potência do atraente para cada amostra bacteriana. Dessa forma, uma menor ou maior quimioatração de uma amostra bacteriana por determinada substância química pode ser um fator importante para colonização e pode explicar porque algumas amostras possuem mais afinidade por um tecido específico.

## 6. CONCLUSÕES

Fumarato, piruvato, succinato, L-aspartato, L-glutamato, L-serina, sulfato de ferro ferroso e L-fucose foram quimioatraentes para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*;

Meso-eritritiol, 17 $\beta$  - estradiol, lactogênio placentário e PBS não foram quimiotáticos para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*;

Deoxicolato de sódio foi quimiorepelente para *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*;

Progesterona foi quimioatraente para algumas amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* somente nas maiores concentrações testadas (acima de 50 ng/mL);

*C. fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* apresentaram comportamento quimiotático diferente por progesterona;

As amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* apresentaram comportamento quimiotático diferente por progesterona;

*C. fetus* subsp. *venerealis* P3 apresentou perfil quimiotático semelhante a amostra de referência *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC 19438<sup>T</sup>.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of general microbiology*, v. 74, p. 77-91, 1973.

ADLER, J. Chemotaxis in bacteria. *Annual review of biochemistry*, v. 44, p. 341–56, 1975.

ALEXANDER, J.K. Energy sources utilized by *Vibrio fetus*. *Journal of bacteriology*, v. 74, n.2, p. 168-70, 1957.

ALI, A.; SOARES, S.C.; SANTOS, A.R.; GUIMARÃES, L.C.; BARBOSA, E.; ALMEIDA, S.S.; ABREU, V.A.; CARNEIRO, A.R.; RAMOS, R.T.; BAKHTIAR, S.M.; HASSAN, S.S.; USSERY, D.W.; ON, S.; SILVA, A.; SCHNEIDER, M.P.; LAGE, A.P.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Campylobacter fetus* subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene*, v. 508, n. 2, p. 145–56, 2012.

ALVES, T.M.; STYNEN, A.P.R.; MIRANDA, K.M.; LAGE, A.P. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina : epidemiologia , diagnóstico e controle. *Pesquisa veterinária brasileira*. v. 31, n. 4, p. 336–344, 2011.

AMIRSHAHI, A.; WAN, C.; BEAGLEY, K.; LATTE, J.; SYMONDS, I.; TIMMS, P. Modulation of the *Chlamydia trachomatis* in vitro transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. *BMC Microbiology*, v. 11, n. 150, p. 1–9, 2011.

ARMITAGE, J.P. Bacterial tactic responses. *Advances in microbial physiology*, v.41, p. 229–289, 1999.

BAKER, N.T.; GRAHAM, L.L. *Campylobacter fetus* translocation across Caco-2 cell monolayers. *Microbial pathogenesis*, v. 49, n. 5, p. 260–72, 2010.

BARRERO, R.A.; MOOLHUIJZEN, P.; INDJEIN, L.; VENUS, B.; KEEBLE-GAGNÈRE, G.; POWER, J.; BELLGARD, M.I.; LEW-TABOR, A.E. Draft genome sequences of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* bv. *venerealis* strain B6 and bv. *intermedius* strain 642-21. *Genome announcements*, v. 2, n. 5, e00943-14, 2014.

BASERISALEHI, M.; BAHADOR, N. Chemotactic behavior of *Campylobacter* spp. in function of different temperatures (37 °C and 42 °C). *Anaerobe*, v. 17, n. 6, p. 459–62, 2011.

- BECKER, D.J.; LOWE, J.B. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, v. 13, n. 7, 41R - 53R, 2003.
- BLAIR, D.F. How bacteria sense and swim. *Annual review of microbiology*, v. 49, p. 489–522, 1995.
- BLASER, M.J. Pathogenesis of *Campylobacter fetus*. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M. J. *Campylobacter*. 3ed., Washington: ASM PRESS, 2008. p. 401-428.
- BOLANDER, F.F.; FELLOWS, R.E. Placental lactogen purification and characterization of bovine. *Journal of biological chemistry*, v. 251, n. 9, p. 2703 - 2708, 1976.
- BOOS, A.; KOHTES, J.; JANSSEN, V., MÜLLING, C.; STELLJES, A.; ZERBE, H.; HÄSSIG, M.; THOLE, HH. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor  $\alpha$ , glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. *Animal reproduction science*, v. 91, p. 55–76, 2006.
- BREN, A; EISENBACH, M. Changing the direction of flagellar rotation in bacteria by modulating the ratio between the rotational states of the switch protein FlIM. *Journal of molecular biology*, v. 312, n. 4, p. 699–709, 2001.
- BURROUGH, E.R.; WU, Z.; SAHIN, O.; ZHANG, Q.; YAEGER, M.J. Spatial distribution of putative growth factors in the guinea pig placenta and the effects of these factors, plasma, and bile on the growth and chemotaxis of *Campylobacter jejuni*. *Veterinary pathology*, v. 49, n. 3, p. 470-481, 2012.
- BYATT, J.C.; WALLACE, C.R.; BREMEL, R.D.; COLLIER, R.J.; BOLT, D.J. The concentration of bovine placental lactogen and the incidence of different forms in fetal cotyledons and in fetal serum. *Domestic animal endocrinology*, v. 4, n. 4, p. 231-241, 1987.
- BYATT, J.C.; WARREN, W.C.; EPPARD, P.J.; STATEN, N.R.; KRIVI, G.G.; COLLIER, R.J. Ruminant placental lactogens : structure and biology. *Journal of animal science*, p. 2911–2923, 1992.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; ODEÓN, A.C.; CIPOLLA, A.L.; ODRIOZOLA, E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Veterinary research communications*, v. 27, n. 5, p. 359–369, 2003.

CINCO, M.; BANFII, E.; RUARO, E.; CREVATIN, D.; CROTTI, D. Evidence for L-fucose (6-deoxy-1-galactopyranose) – mediated adherence of *Campylobacter* spp. to epithelial cells. *FEMS microbiology letters*, v. 21, p. 347 – 351, 1984.

CLARK, B.L. Review of bovine vibriosis. *Australian veterinary journal*, v. 47, n. 3, p. 103-107, 1971.

CONLEY, A.J.; FORD, S.P. Effect of prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis on in vivo and in vitro progesterone production by individual placentomes of cows. *Journal animal science*, v. 65, n. 2, p. 500 - 507, 1987.

CONLEY, A.; HEAD, J.R.; STIRLING, D.T.; MASON, J.I. Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. *Endocrinology*, v. 130, p. 2641–2650, 1992.

COOPER, K.K.; COOPER, M.A.; ZUCCOLO, A.; LAW, B.; JOENS, L.A. Complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain S3. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 6, p. 1491–1492, 2011.

CORBEIL L.B. Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. *Advances in veterinary medicine*, v. 41, p. 217-239, 1999.

CORBEIL, L.B.; DUNCAN, J.R.; SCHURIG, G.G.; HALL, C.E.; WINTER, A.J. Bovine venereal vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infection Immunity*, v. 10, p. 1084-1090, 1974.

CORBEIL, L.B.; CORBEIL, R.R.; WINTER, A.J. Bovine venereal vibriosis: activity of inflammatory cells in protective immunity. *American journal veterinary research*, v. 36, p. 403 – 408, 1975.

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

DAY, C.J.; TIRALONGO, J.; HARTNELL, R.D.; LOGUE, C.A.; WILSON, J.C.; VON ITZSTEIN, M.; KOROLIK, V. Differential carbohydrate recognition by *Campylobacter jejuni* strain 11168: influences of temperature and growth conditions. *Plos One*, v. 4, n. 3, e4927, 2009.

DAY, C.J.; HARTLEY-TASSELL, L.E.; SHEWELL, L.K.; KING, R.M.; TRAM, G.; DAY, S.K.; SEMCHENKO, E.A.; KOROLIK, V. Variation of chemosensory receptor content of *Campylobacter jejuni* strains and modulation of receptor gene expression under different in vivo and in vitro growth conditions. *BMC Microbiology*, v. 12, n. 128, 2012.

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M.J. (Eds.). *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC, 2008, p. 3–25.

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

DINGLE, K.E.; BLASER, M.J.; TU, Z.C.; PRUCKLER, J.; FITZGERALD, C.; VAN BERGEN, M.A.; LAWSON, A.J.; OWEN, R.J.; WAGENAAR, J.A. Genetic relationships among reptilian and mammalian *Campylobacter fetus* strains determined by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 3, p. 977-980, 2010.

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*. *Veterinary bulletin*, v. 62, p. 743 – 775, 1992.

EDWARDS, J. L. *Neisseria gonorrhoeae* survival during primary human cervical epithelial cell infection requires nitric oxide and is augmented by progesterone. *Infection and immunity*, v. 78, n. 3, p. 1202–1213, 2010.

EISENBACH, M. Control of bacteria chemotaxis. *Molecular microbiology*, v. 20, p. 903-910, 1996.

EISENBACH, M. Bacterial chemotaxis. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences/ www.els.net*. Nature Publishing Group, London, 14p, 2001.

EISENBACH, M. Bacterial chemotaxis. In: *Chemotaxis*. London, UK: Imperial College Press, 2004, p. 53-168.

FAHEY, J.V.; ROSSOLL, R.M.; WIRA, C.R. Sex hormone regulation of anti-bacterial activity in rat uterine secretions and apical release of anti-bacterial factor(s) by uterine epithelial cells in culture. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 93, n. 1, p. 59–66, 2005.



FAHMY, D.; DAY, C. J.; KOROLIK, V. Comparative in silico analysis of chemotaxis system of *Campylobacter fetus*. *Archives of microbiology*, v. 194, n. 2, p. 57–63, 2012.

FALKE, J.J.; HAZELBAUER, G.L. Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends in biochemical sciences*, v. 26, n. 4, p. 257-65, 2001.

FALKE, J.J.; BASS, R.B.; BUTLER, S.L.; CHERVITZ, S.A.; DANIELSON, M.A. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 13, p. 457–512, 1997.

FERRERO, R.L.; LEE, A. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. *Journal of general microbiology*, v. 134, p. 53 - 59, 1988.

FIREHAMMER, B.D; BERG, R.L. The use of temperature tolerance in the identification of *Vibrio fetus*. *American journal veterinary research*, v. 26, p. 995, 1965.

FITZGERALD, C.; TU, Z.C.; PATRICK, M.; STILES, T.; LAWSON, A.J.; SANTOVENIA, M.; GILBERT, M.J.; VAN BERGEN, M.; JOYCE, K.; PRUCKLER, J.; STROIKA, S.; DUIM, B.; MILLER, W.G.; LOPAREV, V.; SINNIGE, J.C.; FIELDS, P.I.; TAUXE, R.V.; BLASER, M.J.; WAGENAAR, J.A. *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 64, n. 9, p. 2944-2948, 2014.

FOUTS, D.E.; MONGODIN, E.F; MANDRELL, R.E.; MILLER, W.G.; RASKO, D.A.; RAVEL, J.; BRINKAC, L.M.; DEBOY, R.T.; PARKER, C.T.; DAUGHERTY, S.C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; MADUPU, R.; SULLIVAN, S.A.; SHETTY, J.U.; AYODEJI, M.A.; SHVARTSBEYN, A.; SCHATZ, M.C.; BADGER, J.H.; FRASER, C.M.; NELSON, K.E. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biology*, v.3 p. 72–85, 2005.

FURR, P.M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Factors influencing the ability of different mycoplasmas to colonize the genital tract of hormone-treated female mice. *International journal of experimental pathology*, v. 74, n. 1, p. 97-101, 1993.

GARCIA, M.M.; LUTZE-WALLACE, C.L.; DENES, A.S.; EAGLESOME, M.D.; HOLST, E.; BLASER, M.J. Protein shift and antigenic variation in the S layer of *C. fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of sapA homologs. *Journal of bacteriology*, v. 177, n.8, p. 1976 – 1980, 1995.

GARCIA, M.M.; BROOKS, B.W. *Campylobacter*. In: PRESCOTT, J.F., ZUERMER, R.L., GYLES, C.L., THOEN C, C.D. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2a ed., Iowa States University Press, p. 262 – 272, 1993.

GARCIA, M.M.; EAGLESOME, M.D.; RIGBY, C. Campylobacters important in veterinary medicine. *Veterinary bulletin*, v. 53, n. 9, p. 793-817, 1983.

GARCÍA - GÓMEZ, E.; GONZÁLEZ-PEDRAJO, B.; CAMACHO-ARROYO, I. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed research international*, v. 2013, p. 9282-9290, 2013.

GAYNOR, E. C.; CAWTHRAW, S.; MANNING, G.; MACKICHAN, J.K.; FALKOW, S.; NEWELL, D.G. The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 2, p. 503 – 517, 2004.

GEGNER, J.A.; GRAHAM, D.R.; ROTH, A.F.; DAHLQUIST, F.W. Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell*, v. 70, n. 6, p. 975–982, 1992.

GERTLER, A.; DJIANE, J. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and in vivo studies. *Molecular genetics and metabolism*, v. 75, p. 189–201, 2002.

GIBBONS, R.A. Chemical properties of two mucoids bovine cervical mucin. *Biochemical journal*, v. 73, p. 209 – 217, 1959.

GILBERT, M.J.; MILLER, W.G.; YEE, E.; BLASER, M.J.; WAGENAAR, J.A.; DUIM, B. Complete genome sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* strain 03-427<sup>T</sup>. *Genome announcements*, v. 1, n. 6, e01002-13, 2013.

GOFF, A.K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of reproduction*, v. 71, p. 11–16, 2004.

GÖHLER, A.; XIONG, G.; PAULSEN, S.; TRENTMANN, G.; MASER, E. Testosterone-inducible regulator is a kinase that drives steroid sensing and metabolism in *Comamonas testosteroni*. *Journal of biological chemistry*, v. 283, n. 25, p. 17380–17390, 2008.

- GOLDEN, N.J.; ACHESON, D.W. Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. *Infection and immunity*, v. 70, n. 4, p. 1761-71, 2002.
- GORKIEWICZ, G.; KIENESBERGER, S.; SCHOBER, C.; SCHEICHER, S.R.; GÜLLY, C.; ZECHNER, R.; ZECHNER, E.L. A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 2, p. 502–517, 2010.
- GRAHAM, L.L. *Campylobacter fetus* adheres to and enters INT 407 cells. *Canadian journal of microbiology*, v. 48, p. 995 – 1007, 2002.
- GRIPP, E.; DANIELA HLAHLA, D.; DIDELOT, X.; KOPS, F.; MAURISCHAT, S.; TEDIN, K.; ALTER, T.; ELLERBROEK, L.; SCHREIBER, K.; SCHOMBURG, D.; JANSSEN, T.; BARTHOLOMÄUS, P.; HOFREUTER, D.; WOLTEMATE, V.; UHR, M.; BRENNEKE, B.; GRÜNING, P.; GERLACH, G.; WIELER, L.; SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics*, v. 12, n. 584, 2011.
- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, v. 23, n. 6, p. 1089 – 1097, 1997.
- HANIFA MOURSI, S.A. The effect of sex hormones on *Brucella abortus* in vitro. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*, v. 12, n. 6, p. 505-511, 1965.
- HARTLEY-TASSELL, L. E.; SHEWELL, L.K.; DAY, C.J.; WILSON, J.C.; SANDHU, R.; KETLEY, J.M.; KOROLIK, V. Expression, purification and characterisation of the sensory domain of *Tlpl* of *C. jejuni*. *Zoonoses and public health*, p. 54:64, 2007.
- HAZELEGER, W.C.; Wouters, J.A.; Rombouts, F.M.; Abee, T. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and environmental microbiology*, v. 64, n. 10, p. 3917–3922, 1998.
- HENDRIXSON, D.R.; AKERLEY, B.J.; DIRITA, V.J. Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility. *Molecular microbiology*, v. 40, n. 1, p. 214 - 224, 2001.

HENDRIXSON, D.R.; DIRITA, V.J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular microbiology*, v. 52, n. 2, p. 471–84, 2004.

HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domestic animal endocrinology*, v. 23, n. 1-2, p. 309–320, 2002.

HOFFMANN, B., WAGNER, W.C.; GIMÉNEZ, T. Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. *Biology of reproduction*, v. 15, p. 126–133, 1976.

HOFREUTER, D.; NOVIK, V.; GALÁN, J.E. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell host & microbe*, v. 4, n. 5, p. 425–33, 2008.

HOLLAND, M.D.; HOSSNER, K.L.; WILLIAMS, S.E.; WALLACE, C.R.; NISWENDER, G.D.; ODDE, K.G. Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. I. Fetal profiles. *Domestic animal endocrinology*, v. 14, n. 4, p. 231 - 239, 1997.

HOSSNER, K.L.; HOLLAND, M.D.; WILLIAMS, S.E.; WALLACE, C.R.; NISWENDER, G.D.; ODDE, K.G. Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. II. Maternal profiles. *Domestic animal endocrinology*, v. 14, n. 5, p. 316 - 324, 1997.

HUGENTOBLER, S.A.; SREENAN, J.M.; HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J.; DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reproduction, fertility and development*, v. 22, p. 684 – 694, 2010.

HUGDAHL, M.B.; BEERY, J.T.; DOYLE, M.P. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and immunity*, v. 56, p. 1560–1566, 1988.

HUM, S. Bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Australian veterinary journal*, v. 64, n. 10, p. 319-20, 1987.

HUM, S.; QUINN, K.; BRUNNER, J.; ON, S.L. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian veterinary journal*, v. 75, n. 11, 1997.

IGWEBUIKE, U.M. Trophoblast cells of ruminant placentas - A minireview. *Animal reproduction science*, v. 93, n. 3-4, p. 185–98, 2006.

INABA, T.; OKA, A.; KOKETSU, Y.; NAKAMA, S.; IMORI, T. Progesterone and estrogen synthesis by the bovine placenta. *Japanese journal of animal reproduction*, v. 29, p. 88 - 93, 1983.

IRAOLA, G.; PÉREZ, R.; NAYA, H.; PAOLICCHI, F.; HARRIS, D.; LAWLEY, T.D.; REGO, N.; HERNÁNDEZ, M.; CALLEROS, L.; CARRETTO, L.; VELILLA, A.; MORSELLA, C.; MÉNDEZ, A.; GIOFFRE, A. Complete genome sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*, isolated from the prepuce of a bull. *Genome announcements*, v. 1, n. 4, e00526-13, 2013.

IZHAR, M.; PASMANIK, M.; SHEMESH, M. Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first and second trimesters of gestation. *Biology and reproduction*, v. 46, n. 5, p. 846-852, 1992.

JONES, C.J.; KOOB, B.; STODDART, R.W.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Lectin-histochemical analysis of glycans in ovine and bovine near-term placental binucleate cells. *Cell and tissue research*, v. 278, n. 3, p. 601 - 610, 1994.

JONES, C.J.; DANTZER, V.; LEISER, R.; KREBS, C.; STODDART, R.W. Localisation of glycans in the placenta: a comparative study of epitheliochorial, endotheliochorial, and haemomonochorial placentation. *Microscopy research and technique*, v. 38, n. 1-2, p. 100 - 114, 1997.

KAAKOUSH, N.O.; MAN, S.M.; LAMB, S.; RAFTERY, M.J.; WILKINS, M.R.; KOVACH, Z.; MITCHELL, H. The secretome of *Campylobacter concisus*. *Federation of european biochemical societies journal*, v. 277, n. 7, p. 1606–1617, 2010.

KAAKOUSH, N.O.; DESHPANDE, N.P.; WILKINS, M.R.; TAN, C.G.; BURGOS - PORTUGAL, J.A.; RAFTERY, M.J.; DAY, A.S.; LEMBERG, D.A.; MITCHELL, H. The pathogenic potential of *Campylobacter concisus* strains associated with chronic intestinal diseases. *Plos One*, v. 6, n. 12, e29045, 2011.

KANUNGPEAN, D.; KAKUDA, T.; TAKAI, S. False positive responses of *Campylobacter jejuni* when using the chemical-in-plug chemotaxis assay. *Journal of veterinary medical science*, v. 73, n. 3, p. 389–391, 2011.

KEPPIE, J.; WILLIAMS, A.E.; WITT, K.; SMITH, H. The role of erythritol in the tissue localization of the *brucellae*. *British journal of experimental pathology*, p. 104–108, 1965.

KHANNA, M. R.; BHAVSAR, S.P.; KAPADNIS, B.P. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. *Letters in applied microbiology*, v. 43, n. 1, p. 84–90, 2006.

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; GUSTAFSSON, H. The cow in endocrine focus before and after calving. *Reproduction domestic animal*, v. 39, p. 217–221, 2004.

KING, R. M.; DAY, C.J.; HARTLEY-TASSELL, L.E.; CONNERTON, I.F.; TIRALONGO, J.; MCGUCKIN, M.A.; KOROLIK, V. Carbohydrate binding and gene expression by *in vitro* and *in vivo* propagated *Campylobacter jejuni* after immunomagnetic separation. *Journal of basic microbiology*, v. 53, n. 3, p. 240 - 250, 2013.

KORNMAN, K.S.; LOESCHE, W.J. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infection and immunity*, v. 35, p. 256–263, 1982.

KOROLIK, V. Aspartate chemosensory receptor signalling in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, v. 1, n. 5, p. 414–417, 2010.

KOROLIK, V.; KETLEY, J. Chemotaxis. In: KETLEY, J.M; KONKEL; M.E. *Campylobacter: molecular and cellular biology*. Norwich, UK: Horizon Scientific Press, 2005, p. 349-368.

KOROLIK, V.; KETLEY, J. Chemosensory Signal Transduction Pathway of *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M.J. *Campylobacter*. 3ed., Washington: ASM PRESS, 2008. p. 351-366.

LAGE, A.P. Epidemiologia e controle da campilobacteriose genital bovina. In: *Anais do V simpósio pfizer sobre doenças infecciosas e vacinas para bovinos*. Brasil – 2001. p. 17 – 25, 2001.

LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). *Pecuária de corte*, v.100, p.50-54, 2000.

LAGIER, M.J.; BILOKOPYTOV, I.; COCKERILL, B.; THREADGILL, D.S. Identification and characterization of a putative chemotaxis protein, CheY, from the oral pathogen *Campylobacter rectus*. *Internet journal microbiology*, v. 12, n. 1, 2014.

LA PAZ, M.N.; FONSECA, V.U.; CAMPOS, D.B.; ARTONI, L.P.; SOUSA, L.M.M.C; PAPA, P. C. Produção de progesterona in vitro pelas células do corpo lúteo bovino ao longo da gestação. *Pesquisa veterinária brasileira*, v. 27, n. 9, p. 370 - 376, 2007.

LAWSON, J.R.; MACKINNON, D.J. *Vibrio fetus* infection in cattle. *Veterinary record*, v. 64, p. 763 – 777, 1952.

LAVRENCIC, P.; KAAKOUSH, N.O.; HUINAO, K.D.; KAIN, N.; MITCHELL, H.M. Investigation of motility and biofilm formation by intestinal *Campylobacter concisus* strains. *Gut pathogens*, v. 4, n. 22, p. 1 – 8, 2012.

LEE, A.; O'ROURKE, J.L.; BARRINGTON, P.J.; TRUST, T.J. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infection and immunity*, v. 51, n. 2, p. 536–546, 1986.

LEE, M.D.; NEWELL, D.G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian disease*, v. 50, p. 1–9, 2006.

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.

LERTSETHTAKARN, P.; OTTEMANN, K.M.; HENDRIXSON, D.R. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual review of microbiology*, v. 65, p. 389–410, 2011.

LEWIN, B. The operon. In: LEWIN, B. *Genes IX*. 9 ed. USA: Jones & Bartlett Learning, 2007, p. 300 – 330.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproductive biology and endocrinology*, v. 1, n. 117, p. 1 – 8, 2003.

LI, J.; GO, A.C.; WARD, M.J.; OTTEMANN, K.M. The chemical – in - plug bacterial chemotaxis assay is prone to false positive responses. *BMC research notes*, v. 3, n. 1, p. 77, 2010.

LI, Z; LOU, H.; OJCIUS, D.M.; SUN, A.; SUN, D.; ZHAO, J.; LIN, X.; YAN, J. Methyl - accepting chemotaxis proteins 3 and 4 are responsible for *Campylobacter jejuni* chemotaxis and

jejuna colonization in mice in response to sodium deoxycholate. *Journal of medical microbiology*, v. 63, n. 3, p. 343 - 54, 2014.

LIU, S.; YING, G.G.; LIU, Y.S.; PENG, F.Q.; HE, L.Y. Degradation of norgestrel by bacteria from activated sludge: comparison to progesterone. *Environmental science & technology*, v. 17; v. 47, n. 18, p. 10266-10276, 2013.

LOWRIE, D.B.; PEARCE, J.H. The placental localization of *Vibrio fetus*. *Journal of general microbiology*, v. 3, p. 607-614, 1970.

LUX, R.; SHI, W. Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Critical review oral biology medicine*, v.15; p.207-220, 2004.

MARCHANT, J.; WREN, B.; KETLEY, J. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. *Trends in microbiology*, v. 10, n. 4, p. 155–159, 2002.

MATAMOROS, R.A.; CAAMANO, L.; LAMB, S.V.; REIMERS, T.J. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biology of reproduction*, v. 492, p. 486–492, 1994.

MCFADYEAN, J.; STOCKMAN, S. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. *Abortion in sheep*. London: HMSO, 1913.

MCGOLDRICK, A.; CHANTER, J.; GALE, S.; PARR, J.; TOSZEGHY, M.; LINE, K. Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *Journal of microbiological methods*, v. 94, n. 3, p. 199-204, 2013.

MELAMPY, R.M.; HEARN, W.R.; RAKES, J.M. Progesterone content of bovine reproductive organs and blood during pregnancy. *Journal animal science*, v. 18, p. 307 - 313, 1959.

MILLER, C.E. *Iron acquisition from transferrins by Campylobacter jejuni*. Leicester: Department of Genetics, University of Leicester, 2008. 275p. Thesis.

MILLER, R.D.; MORSE, S.A. Binding of progesterone to *Neisseria gonorrhoeae* and other gram-negative bacteria. *Infection and immunity*, v. 16, p. 115-123, 1977.



MILLER, L.D.; RUSSELL, M.H.; ALEXANDRE, G. Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. *Advances in applied microbiology*, v. 66, p. 53 – 57, 2009.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, p. 732–749, 1938.

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

MISRA, D.S.; KUMAR, A.; SETHI, M.S. Effect of erythritol & sex hormones on the growth of *Brucella* species. *Indian journal of experimental biology*, v. 14, n. 1, p. 65-66, 1976.

MOHANTY, S.B.; PLUMER, G.J.; FABER, J.E. Biochemical and colonial characteristics of some bovine vibriosis. *American journal veterinary research*, v. 23, p. 554, 1962.

MOOLHUIJZEN, P.M.; LEW-TABOR, A.E.; WLODEK, B.M.; AGÜERO, F.G.; COMERCI, D.J.; UGALDE, R.A.; SANCHEZ, D.O.; APPELS, R.; BELLGARD, M. Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. *BMC microbiology*, v. 9, p. 86, 2009.

MOSIER, S.; NAKAO, M.; HERMAN, M.; WALIA, S.K.; ROSENTHAL, N.; HURD, C.; MOUDGIL, V.K. Progesterone binding in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 287, n. 1, pp. 160-166, 1991.

MSHELIA, G.D.; AMIN, J.D.; WOLDEHIWET, Z.; MURRAY, R.D.; EGWU, G.O. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in domestic animals*, v. 45, n. 5, p. e221–30, 2010.

MUNSON, L.; KAO, J.J.; SCHLAFER, D.H. Characterization of glycoconjugates in the bovine endometrium and chorion by lectin histochemistry. *Journal of reproduction & fertility*, v. 87, p. 509 – 517, 1989.

MURAOKA, W.T.; ZHANG, Q. Phenotypic and genotypic evidence for L -fucose utilization by *Campylobacter jejuni*. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 5, p. 1065 – 1075, 2011.

NAIKARE, H.K.; PALYADA, K.; PANCIERA, R.; MARLOW, D.; STINTZI, A. Major role for *feoB* in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. *Infection and immunity*, v. 74, p. 5433-5444, 2006.

NGUYEN, P.T.T.; CONLEY, A.J.; SOBOLEVA, T.K.; LEE, R.S. Multilevel regulation of steroid synthesis and metabolism in the bovine placenta. *Molecular reproduction & development*, v. 79, p. 239 – 254, 2012.

OLDS, D; VANDEMARK, N.L. Composition of luminal fluid in bovine female genitalia. *Fertility and sterility*, v.8, p. 345-354, 1957.

ON, S.L.W. Taxonomy, phylogeny, and methods for the identification of *Campylobacter* species. In: KETLEY, J.M; KONKEL; M.E. *Campylobacter: molecular and cellular biology*. Norwich, UK: Horizon Scientific Press, 2005, p. 13-42, 2005.

ON, S.L.; HARRINGTON, C.S. Evaluation of numerical analysis of PFGE DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *Journal applied microbiology*, v. 90, p. 285–293, 2001.

OSBORNE, J.C.; BOURDEAU, A.L. The stimulated of *Vibrio fetus* by the use of hormones. *Journal of bacteriology*, v. 70, n. 2, p. 250, 1955.

PARKHILL, J.; WREN, B.W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J.M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R.M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A.V.; MOULE, S.; PALLAN, M.J.; PENN, C.W.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM; M.A.; RUTHERFORD, K.M.; VAN VLIET, A.H.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, p. 665–668, 2000.

PARKYNSON, J.S. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, v. 73, p. 857-871, 1993.

PASTER, B.J.; GIBBONS, R.J. Chemotactic response to formate by *Campylobacter concisus* and its potential role in gingival colonization. *Infection and immunity*, v. 52, n. 2, p. 378 - 383, 1986.

PELLEGRIN, A.O.; LAGE, A.P.; SERENO, J.B.; RAVAGLIA, E.; COSTA, M.; LEITE, R.C. Bovine genital campylobacteriosis in pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, v. 55, n. 3, 2002.

PELLEGRIN, A. O. A campilobacteriose e a tricomonose são doenças reemergentes? *Embrapa*, Corumbá, MS, n. 41, p. 1-23, 2002.

PIMENTEL, S.M.; PIMENTEL, C.A.; WESTON, P.G.; HIXON, J.E.; WAGNER, W.C. Progesterone secretion by the bovine fetoplacental unit and responsiveness of corpus lutea to steroidogenic stimuli at two stages of gestation. *American journal veterinary research*, v. 47, n. 9, p. 1967 – 1971, 1986.

PORTER, S.L.; WADHAMS, G.H.; ARMITAGE, J.P. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature*, v. 9, p. 153 - 165, 2011.

RAHMAN, H.; KING, R.M.; SHEWELL, L.K.; SEMCHENKO, E.A.; HARTLEY-TASSELL, L.E.; WILSON, J.C.; DAY, C.J.; KOROLIK, V. Characterisation of a multi-ligand binding chemoreceptor CcmL (Tlp3) of *Campylobacter jejuni*. *Plos pathogens*, v. 10, n. 1, e1003822, 2014.

RAKES, J.M. *Progesterone content of bovine reproductive organs during pregnancy - retrospective thesis and dissertations*. Thesis, Iowa State University, paper 1615, 105 p., 1958.

RAMS, T.E.; FEIK, D.; SLOTS, J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral microbiology and immunology*, v. 8, p. 230 – 235, 1993.

REIMERS, T.J.; ULLMANN, M.B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biology of reproduction*, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

RUIZ - PALACIOS, G.M.; CERVANTES, L.E.; RAMOS, P.; CHAVEZ – MUNGUIA, B.; NEWBURG, D.S. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of biological chemistry*, v. 278, p. 14112 –14120, 2003.

SALAMA, S.M.; GARCIA, M.M.; TAYLOR, D.E. Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *International journal systematic bacteriology*, v. 42, p. 446–450, 1992.

SAMUELSON, J.D.; WINTER, J.A. Bovine vibriosis: The nature of the carrier state in the bull. *Journal infection disease*, v. 116, p. 573, 1966.

SANGARI, F.J.; AGÜERO, J.; GARCÍA – LOBO, J.M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology*, v. 146, n. 2, p. 487 – 495, 2000.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, v. 17, n. 1, p. 14–56, 2004.

SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; PFARRER, C.; LEISER, R.; HOFFMANN, B. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biology of reproduction*, v. 61, p. 797 – 801, 1999.

SCHULER, G.; GREVEN, H.; KOWALEWSKI, M.P.; DÖRING, B.; OZALP, G.R.; HOFFMANN, B. Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by - products of trophoblast giant cell differentiation? *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, v. 116, n. 7, p. 429 - 436, 2008.

SCHURIG, G.D.; HALL, C.E.; BURDA, K.; CORBEIL, L.B.; DUNCAN, J.R.; WINTER, A.J. Infection patterns in heifers following cervicovaginal or intrauterine instillation of *Campylobacter (Vibrio) fetus venerealis*. *Cornell veterinary*, v. 64, p. 533-548, 1974.

SCHURIG, G.D.; HALL, C.E.; BURDA, K.; CORBEIL, L.B.; DUNCAN, J.R.; WINTER, A.J. Persistent genital tract infection with *Vibrio fetus intestinalis* associated with serotypic alteration of the infecting strain. *American journal veterinary research*, v. 34, n. 11, p. 1399-1403, 1973.

SCHUSTER, S.C.; SWANSON, R.V.; ALEX, L.A.; BOURRET, R.B.; SIMON, M.I. Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance. *Nature*, v. 365, p. 343–34, 1993.

SCOTT, D.R.; MARCUS, E.A.; WEN, Y.; OH, J.; SACHS, G. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 104, n. 17, p. 7235 –7240, 2007.

SHEMESH, M.; HANSEL, W.; STRAUSS, J.F. Calcium-dependent, cyclic nucleotide-independent steroidogenesis in the bovine placenta. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 81, n. 20, p. 6403 - 6407, 1984.

SHEMESH, M.; IZHAR, M.; PASMANIK, M.; SHORE, L.S. Regulation of steroidogenesis in the bovine placenta. *Journal of physiology and pharmacology*, v. 43, n. 4, suplementar 1, p. 153 - 163, 1992.

SKIRROW, M.B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of comparative pathology*, v. 111, n. 2, p. 113-49, 1994.

SMIBERT, R.M. Nutrition of *Vibrio fetus*. *Journal of bacteriology*, v. 85. p. 394 - 398, 1963.

SMIBERT, R.M. The genus *Campylobacter*. *Annual review of microbiology*, v. 32, p. 673–709, 1978.

SMITH, H.; KEPPIE, J.; PEARCE, J.H.; FULLER, R.; WILLIAMS, A.E. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. I. Isolation of *Br. abortus* from bovine foetal tissue. *British journal of experimental pathology*, v. 42, p. 631 - 637, 1961.

SMITH, H. Biochemical challenge of microbial pathogenicity. *Bacteriological reviews*, v. 32, n. 3, p. 164–184, 1968.

SPRINGER, W.R.; KOSHLAND, D.E. Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 74, n. 2, p. 533–537, 1977.

STABENFELDT, G.H.; OSBURN, B.I.; EWING, L.L. Peripheral plasma progesterone levels in the cow during pregnancy and parturition. *American journal of physiology*, v.218, n. 2, p. 571 - 575, 1970.

STAHL, M.; FRIIS, L.M.; NOTHAFT, H.; LIU, X.; LI, J.; SZYMANSKI, C.M.; STINTZI, A. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 26, n. 108(17), p. 7194-7199, 2011.

STAHL, M.; BUTCHER, J.; STINTZI, A. Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, p. 1-10, 2012.

STINTZI, A. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *Journal of bacteriology*, v. 185, n. 6, p. 2009 – 2016, 2003

STOCK, J.B.; SURETTE, M.G. Chemotaxis. In: NEIDHARDT, F.C. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C, 1996, vol. 1, p. 1103–1129.

STOESSEL, F. *Las enfermedades venereas de los bovino: trichomoniasis y vibriosis genital*. Zaragoza Acribia, 1982, 163p.

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

STYNEN, A.P.R.; PELLEGRINI, A.O.; FÓSCOLOI, 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. *Arquivo brasileiro medicina veterinária e zootecnia*, v. 55, p. 766 – 769, 2003.

STYNEN, A.P.R.; LAGE, A.P.; MOORE, R.J.; REZENDE, A.M.; RESENDE, V.A.; RUY, P.C.; DAHER, N.; RESENDE, M.; ALMEIDA, S.S.; SOARES, S.C.; ABREU, V.A.; ROCHA, A.A.; DOS SANTOS A.R.; BARBOSA, E.G.; COSTA, D.F.; DORELLA, F.A.; MIYOSHI, A.; LIMA, A.R.; CAMPOS, F.D.; SÁ, P.G.; LOPES, T.S.; RODRIGUES, R.M.; CARNEIRO, A.R.; LEÃO, T.; CERDEIRA, L.T.; RAMOS, R.T.; SILVA, A.; AZEVEDO, V.; RUIZ, J.C. Complete genome sequence of type strain *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354<sup>T</sup>. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 20, p. 5871–2, 2011.

TAKATA, T.; FUJIMOTO, S.; AMAKO, K. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infection and immunity*, v.60, p. 3596-3600, 1992.

TAREEN, A.M.; DASTI, J.I.; ZAUTNER, A.E.; GROSS, U., LUGERT, R. *Campylobacter jejuni* proteins Cj0952c and Cj0951c affect chemotactic behaviour towards formic acid and are important for invasion of host cells. *Microbiology*, v. 156, n. Pt 10, p. 3123–35, 2010.

TAYLOR, B.L.; ZHULIN, I.B.; JOHNSON, M.S. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annual review microbiology*, v. 53:103–128, 1999.

THOMPSON, S.A. *Campylobacter* surface - layers (S - layers) and immune evasion. *Annals periodontology*, v. 7, n. 1, p. 43 – 53, 2002.

TSO, W.W.; ADLER, J. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 118, n. 2, p. 560-576, 1974.

TSUMAGARI, S.; KAMATA, J.; TAKAGI, K.; TANEMURA, K.; YOSAI, A.; TAKEISHI, M. Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *Journal reproduction and fertility*, v. 98, p. 631–636, 1993.

TSUMAGARI, S.; KAMATA, J.; TAKAGI, K.; TANEMURA, K.; YOSAI, A.; TAKEISHI, M. 3 $\beta$  – Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. *Journal of reproduction and fertility*, v. 102, n. 1, 35 - 39, 1994.

TU, Z.C; EISNER, W.; KREISWIRTH, B.N.; BLASER, M.J. Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 7, p. 3334–3340, 2005.

VAN BERGEN, M.A.; DINGLE, K.E.; MAIDEN, M.C.; NEWELL, D.G.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L., VAN PUTTEN, J.P.; WAGENAAR, J.A. Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *Journal clinical microbiology*, v. 43, n. 12, p. 5888 – 5898, 2005.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L.; MILLER, W.G.; YEE, E.; BONO, J.L.; RIJNSBURGER, M.; CAMPERO, C.; WAGENAAR, J.A.; DUIM, B. First closed genome sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius*. *Genome announcements*, v. 2, n. 1, e01246-13, 2014.

VAN VLIET, A.H.; BAILLON, M.L.; PENN, C.W.; KETLEY, J.M. *Campylobacter jejuni* contains two *fur* homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *Journal of bacteriology*, v. 181, p. 6371-6376, 1999.

VANDEPLASSCHE, M.; FLORENT, A.; BOUTERS, R.; HUYSMAN, A.; BRONE, E.; DEKEYSER, P. The pathogenesis, epidemiology, and treatment of *Vibrio fetus* infection in cattle. *Comptes rendus de recherches, Institut encouragement recherche scientifique industrie agriculture*. v.29, n.18, 1963.

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. *Veterinary microbiology*, v. 93, p. 121–132, 2003.

VEGGE, C.S.; BRØNDSTED, L.; LI, Y.P.; BANG, D.D.; INGMER, H. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5308–14, 2009.

VÉRON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 23, p. 122–34, 1973.

VINZENT, R.; ALLOY, A. 1952. Avortement vibronien de la brebis. Remarques sur la culture de *Vibrio fetus*. *Recueil de médecine vétérinaire*, v. 128, p. 541-543, 1952.

WAGENAAR, J.A.; VAN BERGEN, M.A.P.; NEWELL, D.G.; GROGONO- THOMAS, R.; DUIM, B. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *Journal of clinical microbiology*, v. 39, n. 6, p. 2283-2286, 2001.

WALSH, A.F.; WHITE, F.H.; WARNICK, A.C. The effects of erythritol, FSH, and female gonadal hormones on the growth in vitro of *Vibrio fetus* var. *venerealis*. *Journal of reproduction and fertility*, v. 32, p. 465-471, 1973.

WANG, C.M.; SHIA, W.Y.; JHOU, Y.J.; SHYU, C.L. Occurrence and molecular characterization of reptilian *Campylobacter fetus* strains isolated in Taiwan. *Veterinary microbiology*, v. 164, n. 1-2, p. 67-76, 2013

WASSENAAR, T.M.; NEWELL, D.G. The genus *Campylobacter*. In: DWORKIN, M. *Prokaryotes*, 3ed, v. 7, p. 119-138, 2006.

WILL; S.E.A.; RICI, R.E.; MIGLINO, M.A.; ANTUENS, A. Trace element of bovine placenta: histological analysis and distribution maps using  $\mu$ SXRF. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. *Microscopy: science, technology, applications and education*, v. 2, n. 4, p. 1039-1046, 2010.

WINTER, A.J.; CLARK, B.L.; PARSONSON, I.M.; DUNCAN, J.R.; BIER, P.J. Nature of immunity in the male bovine reproductive tract based upon responses to *Campylobacter fetus* and *Trichomonas fetus*. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 137, p. 745 – 752, 1981.

WOODALL, C.A.; JONES, M.A.; BARROW, P.A.; HINDS, J.; MARSDEN, G.L.; KELLY, D.J.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; MASKELL, D.J. *Campylobacter jejuni* gene expression in the chick cecum: evidence for adaptation to a low-oxygen environment. **Infect and immunity**, v. 73, n. 8, p. 5278-5285, 2005.

WOODING, F.B.P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v. 13. n. 2, 101-113, 1992.

WOODING, F.B.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R.B. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta*, v. 17, p. 75-86, 1996.



WOOLDRIDGE, K.G; VAN VLIET, A.H.M. Iron transport and regulation. In: KETLEY, J.M; KONKEL; M.E. *Campylobacter: molecular and cellular biology*. Norwich, UK: Horizon Scientific Press, 2005, p. 293- 310.

WUICHET, K.; ZHULIN, I.B. Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Science signaling*, 3:ra50, 2010.

XU, Q.; DZIEJMAN, M.; MEKALANOS, J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholera* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 100, n. 3, p. 1286–1291, 2003.

YAO, R.; BURR, D.H.; GUERRY, P. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Molecular microbiology*, v. 23, p. 1021-1031, 1997.

YOKOYAMA, M.; HINODE, D.; MASUDA, K.; YOSHIOKA, M.; GRENIER, D. Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts. *Oral microbiology and immunology*, v. 20, p. 239 – 243, 2005.

YONEKAWA, H.; HAYASHI, H.; PARKINSON, J.S. Requirement of the cheB function for sensory adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 156, n. 3, p. 1228–1235, 1983.

ZAUTNER, A.E.; TAREEN, A.M.; GROß, U.; LUGERT, R. Chemotaxis in *Campylobacter jejuni*. *European journal of microbiology e immunology*, v. 2, n. 1, p. 24–31, 2012.

ZEMJANIS, R.; HYOT, H.H. The effect of growth factors on *Vibrio fetus*. *American journal veterinary research*, v. 21, p. 1109-1113, 1960.

## 8. ANEXOS

Anexo A - Quimiotaxia de *C. fetus* por substâncias químicas do útero bovino gestante

