MAYSA SANTOS BARBOSA

Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas
recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

MAYSA SANTOS BARBOSA

Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas
recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Barbosa, Maysa Santos.

Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae* / Maysa Santos Barbosa. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micoplasma.

Versão do título para o inglês: Cloning, purification and characterization of recombinant antigenic protein of *Mycoplasma agalactiae*

1. *Mycoplasma agalactiae* 2. Agalaxia contagiosa 3. Proteína recombinante 4. Antigenos I. Timenetsky, Prof. Dr. Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0119/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maysa Santos Barbosa

Titulo da Dissertação/Tese: Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae*.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

☐ **Aprovado(a)** ☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 77 nas fls. 21 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jorge Timenetsky**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de Mycoplasma agalactiae*" do qual participam o(s) aluno(s) **Maysa Santos Barbosa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **18.08.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha família, especialmente à minha mãe, pelo exemplo de força e perseverança, e pelo apoio fundamental para a concretização desse trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº do processo 2014/09425-7 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) nº do processo 443400/ 2014-8 pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, guia do meu caminho.

Aos meus pais, Joilton e Neide, e ao meu irmão, Júnior, pelo apoio e por estarem sempre comigo apesar da distância. Acima de tudo, obrigada pelo esforço e atenção ao longo de todos esses anos que tornaram possível a finalização de mais uma etapa. À minha avó, Geny (*in memoriam*) pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador, Profº Drº Jorge Timenestky, pela oportunidade no desenvolvimento desse trabalho, por todo conhecimento compartilhado e pelo incentivo ao estudo da micoplasmologia.

Ao meu co-orientador, Profº Drº Lucas Miranda Marques, compartilhou comigo mais que conhecimentos acadêmicos, mas me ensinou também a trilhar os caminhos do bem. Obrigada por todo o incentivo e ao tempo dedicado nesse trabalho.

À minha co-orientadora, Profª Drª Ana Márcia de Sá Guimarães, pela colaboração e paciência. Agradeço por todos os ensinamentos os quais foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Aricelma França (Celminha), pelo apoio, companhia e carinho durante a realização deste trabalho. Obrigada pela paciência e por todo o conhecimento passado. Agradeço pelo apoio técnico, pelas horinhas de distração, pelas conversas, pelos conselhos e as xícaras de café sempre bem vindas.

Ao Profº Drº Luís Carlos por abrir as portas do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) para o desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho. A Rubens, pela experiência compartilhada. Obrigada à todos do LDV que me ajudaram de alguma forma, principalmente à Carol, Dalva, Deni, Eduardo, Gisela, Hélic, Lenon, Mônica, Robert, Samuel e Sara.

Ao Profº Drº Leandro Martins, que me apresentou à bioinformática e auxiliou nas análises iniciais deste trabalho.

Ao Profº Drº Elmiro Rosendo do Nascimento da Universidade Federal Fluminense pela disponibilização da estirpe utilizada nesse trabalho.

Aos amigos do laboratório de Micoplasma, Aline, Camila, Cristina, Guilherme, Izadora, Julieta, Lorena, Natália, Patrícia, Régis e Verena. Obrigada pelo companheirismo do dia-a-dia. Apreendi muito com todos vocês. Alguns,

responsáveis por me ensinarem as primeiras técnicas em biologia molecular ainda na iniciação científica. Sem vocês este trabalho teria sido mais difícil.

Aos amigos companheiros de casa, Abrahão, Aline, Izadora e Verena. Obrigada pelos momentos felizes, pelas risadas e pela amizade.

Aos amigos de longa data, Alana, Dreike, Kamila, Ricardo, Sabrina e Sabrine, por compartilharem comigo momentos tristes e alegres e por sempre me ouvirem nos momentos de dúvidas e desespero. À Driu e Priscila, por me ajudarem na conquista de novos caminhos, obrigada pelo apoio no início dessa jornada.

Aos amigos da Universidade Federal da Bahia, em especial à Fernanda, Hellen e Nathan. Obrigada pelas horas de estudos e boas risadas.

Às funcionárias da secretaria do departamento de microbiologia/pós graduação do ICB II, Gisele, Caciara, Naide e Izabel. Muito obrigada por todo o auxílio ao longo desses dois anos. Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II. Aos funcionários da portaria, segurança, manutenção e limpeza.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pelo auxílio prestado na preparação deste trabalho.

Aos demais amigos e familiares não citados e que ao longo da minha vida ou dos dois últimos anos me desejaram força e sucesso. Muito obrigada!

A todos aqui não mencionados que de alguma forma viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

*“I was taught that the way of
progress was neither swift nor
easy.”*

Marie Curie

RESUMO

BARBOSA, M. S. **Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae***. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A agalaxia contagiosa (AC) de pequenos ruminantes é uma doença de notificação obrigatória à World Organisation for Animal Health (OIE) que causa severas perdas econômicas para produção de ovinos e caprinos mundialmente. Animais acometidos apresentam alterações clínicas como redução da produção de leite, febre, septicemia, mastite, aborto, e artrite severa, que podem levar à morte. AC é uma síndrome multietiológica, isto é, três micro-organismos têm sido identificados como causadores da doença: *Mycoplasma agalactiae*, considerado historicamente o principal; *M. capricolum* subsp. *capricolum*; e *M. mycoides* subsp. *capri*. Apesar de seu reconhecido impacto na produção animal, pouco se sabe sobre os fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade do *M. agalactiae*, incluindo seu “core” antigênico. Desta maneira, o presente estudo possuiu como objetivo a identificação, purificação e caracterização de proteínas antigênicas de *M. agalactiae*. Para tanto, sequências de DNA codificantes (CDS) de proteínas de *M. agalactiae* foram analisadas por meio de algoritmos de bioinformática para avaliar a localização celular das proteínas e identificação de epítomos lineares e conformacionais para células B. Foram preditas 156 proteínas localizadas na membrana ou indiretamente ligadas à ela. Após a aplicação dos algoritmos de predição antigênica, quatro proteínas de superfície com potencial antigênico (WP_011949419.1, WP_011949418.1(P40), WP_011949336.1, WP_011949770.1) foram selecionadas para análise posteriores. Essas proteínas foram expressas por plasmídeos específicos em sistema heterólogo de *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia de afinidade com níquel imobilizado. Em seguida, as proteínas purificadas foram avaliadas quanto a antigenicidade em *Western blotting* utilizando soros de caprinos naturalmente infectados com *M. agalactiae*. Todas as proteínas expressas foram imunorreativas aos soros de caprinos naturalmente infectados, demonstrando que as proteínas utilizadas nesse estudo são possivelmente antigênicas e possuem epítomos acessíveis. Mais estudos devem ser realizados para avaliar a antigenicidade dessas proteínas contra soro de animais sabidamente negativos para *M. agalactiae*.

Palavras-chaves: *Mycoplasma agalactiae*. Agalaxia contagiosa. Proteína recombinante. Antígenos.

ABSTRACT

BARBOSA, M. S. **Cloning, purification and characterization of recombinant antigenic protein of *Mycoplasma agalactiae***. [Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae*]. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The Contagious agalactia (CA) of small ruminants is a notifiable disease to the World Organisation for Animal Health (OIE) and it cause severe economic losses to sheep and goats worldwide. Affected animals show clinical changes such as reduction of milk production, fever, septicemia, mastitis, abortion, and severe arthritis, which can lead to death. AC is a multi etiological syndrome wich three microorganisms have been identified as the cause of the disease: *Mycoplasma agalactiae*, historically considered the principal; *M. capricolum* subsp. *capricolum*; and *M. mycoides* subsp. *capri*. Despite its recognized impact on animal production, little is known about the virulence factors and pathogenic mechanisms of *M. agalactiae*, including its "core" antigen. Thus, the present study has owned the objective of identification, purification and characterization of antigenic proteins of *M. agalactiae*. For this purpose, DNA coding sequences (CDS) proteins from *M. agalactiae* were analyzed by bioinformatic algorithms to assess the cellular localization of proteins and identification of linear and conformational epitopes for B cells. It were predicted 156 proteins located in the membrane or indirectly linked to it. After application of prediction algorithms antigenic four surface proteins with antigenic potential (WP_011949419.1, WP_011949418.1 (P40), WP_011949336.1, WP_011949770.1) were selected for further analysis. These proteins were expressed in specific plasmids in heterologous system (*Escherichia coli*) and purified by affinity chromatography on immobilized nickel. Then the purified proteins were assayed for antigenicity in Western blotting using goat sera naturally infected with *M. agalactiae*. All expressed proteins were immunoreactive with sera from naturally infected goats, demonstrating that the proteins used in this study are available and have possibly antigenic epitopes. More studies should be conducted to evaluate the antigenicity of these proteins against known negative serum of animals to *M. agalactiae*.

Keywords: *Mycoplasma agalactiae*. Agalactia contagious. Recombinant protein. Antigens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da produção de caprinos no Brasil em 2014	19
Figura 2 - Lipoproteínas em micoplasmas.....	22
Figura 3 - Estrutura química de lipoproteínas bacterianas	23
Figura 4 - Estrutura de adesão em <i>M. pneumoniae</i> estirpe M129.....	25
Figura 5 - Crescimento de <i>M. agalactiae</i> em meio SP4	30
Figura 6 - Fluxograma das análises <i>in silico</i> para seleção das proteínas alvo.....	55
Figura 7 - Predições pelo <i>web-software</i> IEDB <i>Analysis Resource</i> e CBTOPE.....	57
Figura 8 - Perfil de expressão e purificação das proteínas de membrana recombinantes de <i>M. agalactiae</i> em gel de poliacrilamida e reconhecimento das proteínas por anticorpo pelo <i>Western blotting</i>	61
Figura 9 - Proteínas recombinantes purificadas.	62
Figura 10 - Reconhecimento das proteínas recombinantes com o <i>pool</i> de soro de caprinos.....	64
Figura 11 - Avaliação da reatividade dos soros de animais reativos a proteína recombinante P40 e extrato total de <i>M. agalactiae</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Iniciadores utilizados para identificação de <i>M. agalactiae</i>	44
Tabela 2 -Identificação das CDSs selecionadas, oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento	46
Tabela 3 - Iniciadores utilizados no sequenciamento	48
Tabela 4 -Comparação entre <i>software</i> para predições de peptídeo sinal e predições da topologia das proteínas de membrana descritas nesse trabalho.....	56
Tabela 5 -Características únicas das proteínas como unidades de repetição e frequência de aminoácidos obtidas através do <i>software</i> SAPS	58
Tabela 6 -Identificação das CDSs selecionadas de <i>M. agalactiae</i> estirpe PG2	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

6xHis – Sequência específica de seis resíduos de histidina

μL - Microlitro

μM – Micromolar

μg – Micrograma

AC - Agalaxia contagiosa

ATP - Adenosina trifosfato

BCA - *Bicinchoninic acid* (ácido bicinconínico)

BSA - *Bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)

C - Citosina

CDS - *Coding sequence* (sequência codificante)

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfatado

D.O. - Densidade óptica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

FAO - *Food and Agriculture Organization of The United Nations*

G – Guanina

Hib - *Haemophilus influenzae* tipo b

HCl - Ácido clorídrico

HRP - *Horseradish Peroxidase*

IDT - *Integrated DNA Technologies*

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

KCl - Cloreto de potássio

Kg - Quilograma

Kpb - Quilo pares de bases

LB - Luria Bertani

LPP - Lipoproteína

M - Molar

mA - Miliampere

mg - Miligrama

mL – Mililitro

MLST - *Multilocus sequence typing* (Tipagem por sequenciamento de multilocus)

mM – Milimolar

mm - Milímetros

NaCl - Cloreto de Sódio

ng - Nanograma

nm - Nanômetros

OIE - *World Organization for Animal Health*

PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salina)

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

PMSF - *Phenylmethane sulfonyl fluoride* (Fluoreto de fenil-metil-sulfonila)

PPCB - Pleuropneumonia contagiosa bovina

PPCC - Pleuropneumonia contagiosa caprina

PFGE - *Pulsed-field gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de campo pulsado)

rRNA - *Ribosomal ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico ribossomal)

rpm - Rotações por minuto

SDS - *Sodium dodecyl sulfate* (Sulfato dodecil de sódio)

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis* (Sulfato dodecil de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida)

SPase II - Peptidase sinal II

SRD - Sem Raça Definida

TEMED - *Tetramethyl ethylenediamine* (Tetrametil-etilenodiamina)

VNTR - *Multilocus variable number tandem-repeat* (Repetição em tandem de número variável)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Caprinocultura.....	18
1.2 Características gerais dos <i>Mollicutes</i>	20
1.3 Moléculas imunodominantes e fatores de virulência em micoplasmas.....	21
1.3.1 Lipoproteínas (LPP)	21
1.3.2 Citoaderência	24
1.3.2 Invasão.....	26
1.3.3. Superantígenos	26
1.3.4 Antígenos Variáveis de Superfície	27
1.4 <i>Mycoplasma agalactiae</i> e a Agalaxia contagiosa	28
1.4.1 História e Impacto econômico	28
1.4.2 Etiologia.....	28
1.4.2.1 <i>Mycoplasma agalactiae</i>	29
1.4.3 Epidemiologia.....	31
1.4.4 Transmissão da doença	33
1.4.5 Patogênese e sinais clínicos	34
1.4.6 Diagnóstico.....	35
1.4.7 Vacinas: Prevenção e controle.....	36
1.4.7.1 Vacinologia Reversa.....	38
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivos gerais	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3 METODOLOGIA	42
3.1 Análise <i>in sílico</i> de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	42
3.2 Estirpe bacteriana e condições de cultivo	43
3.3 Extração de DNA do <i>M. agalactiae</i> e amplificação da região de interesse para confirmação da estirpe.....	43
3.4 Desenho de iniciadores e amplificação das CDSs selecionadas	44
3.5 Clonagem e transformação	47
3.6 Expressão proteica	48
3.7 Análise das frações solúveis e insolúveis de <i>E. coli</i> recombinante.....	49
3.8 Extração e purificação proteica	50

3.9 Quantificação de proteínas	51
3.10 Ensaios de antigenicidade	51
3.10.1. Amostras de soro caprino.....	51
3.10.2 Extrato total de <i>M. agalactiae</i> GM 719	52
3.10.3 ELISA Indireto (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) para seleção de amostras reativas à proteína recombinante P40	52
3.10.4 <i>Western blotting</i>	53
3.10.5 ELISA Indireto para proteínas recombinantes e extrato do <i>M. agalactiae</i>	53
3.11 Análise estatística	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Análise <i>in sílico</i> de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	55
4.2 Amplificação e clonagem	59
4.3 Expressão das proteínas	59
4.4 Purificação proteica	62
4.5 Análise da antigenicidade das proteínas recombinantes.....	63
4.5.1. Seleção de amostras reativas à P40.....	63
4.5.2 <i>Western blotting</i>	63
4.5.2 ELISA Indireto	64
5 DISCUSSÃO	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS*	74
APÊNDICE A - Caracterização dos soros de caprinos provenientes de propriedades da região sudoeste do estado da Bahia	94
APÊNDICE B - Alinhamento entre os ortólogos da proteína WP_011949418.1 (P40)	98
APÊNDICE C - Alinhamento entre os ortólogos da proteína WP_011949336.1.	99
APÊNDICE D - Alinhamento entre ortólogos da proteína WP_011949770.1	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caprinocultura

Em 2014, o rebanho mundial de caprinos foi estimado em aproximadamente 1 bilhão de animais, os quais concentram-se nos países em desenvolvimento, principalmente China, Índia e Nigéria. O Brasil possui o maior rebanho caprino das Américas e tem o 22º rebanho mundial com aproximadamente 9 milhões de animais os quais estão distribuídos em 436 mil estabelecimentos pelo país (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2015; WORLD ORGAZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE), 2014). Nos últimos anos, a caprinocultura tem se destacado no agronegócio brasileiro por ser uma atividade econômica em expansão. Há novos arranjos produtivos em regiões tradicionais e crescimento da atividade comercial em regiões com menor produção. O Nordeste brasileiro destaca-se por possuir mais de 90% de todo rebanho nacional, principalmente na Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará. Seguido pela região Sul, a segunda região em relevância de rebanho, mas que possui apenas 4% do total (figura 1) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2014; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), 2016).

O rebanho de caprinos do Brasil é constituído principalmente por animais denominados SRD – Sem Raça Definida, os quais são cruzamentos da raça nativa conhecida como Crioulo com raças importadas. A raça Crioulo é descendente direta dos caprinos ibéricos trazidos ao Brasil pelos portugueses no período de colonização. As raças exóticas de cabras leiteiras exploradas na região Nordeste são, basicamente, as seguintes: Saanen, Parda Alpina, Toggemburg e Anglo-Nubiana. Dentre as raças puras exóticas que se adaptaram às condições do clima nordestino, destacam-se na produção leiteira a raça: Canindé; na produção de carne e pele: Bôer, Moxotó e Repartida; e na produção dos três produtos: Marota e Graúna (FILHO; JUNIOR; YAMAMOTO, 2010; MCMANUS; PAIVA; LOUVANDINI, 2010; MADRUGA et al., 1999).

A importância econômico-social dos caprinos criados no Brasil reside na produção de leite, carne e pele. A produção de leite de cabra é de aproximadamente 21 milhões de litros anualmente (1,7% da produção de leite de cabras mundial) e

envolve, em grande parte, empresas de pequeno porte. Geralmente, essa produção é utilizada para a subsistência das famílias, não tendo uma destacada indústria ou um importante comércio de laticínios de cabra. Sabe-se que mesmo com o tamanho do rebanho no Nordeste, há pouco aproveitamento de seu potencial de produção de leite de cabra e derivados. Da mesma forma, apesar da carne caprina ser uma das mais magras, seu consumo ainda é baixo nacionalmente, estimado em menos de 1,0 Kg per capita/ano. A maioria dessa carne comercializada para consumo tem origem no abate clandestino (menos de 5% da carne comercializada possui inspeção federal ou estadual, no Nordeste), enquanto uma pequena parcela se destina ao consumo de subsistência. A produção de pele de caprinos, por sua vez, consiste apenas em uma atividade complementar. A caprinocultura, porém, vem dando sinais de crescimento econômico, principalmente devido à implantação de agroindústrias, frigoríficos e abatedouros para pequenos ruminantes em todo Brasil, sobretudo nas grandes cidades (CORDEIRO; CORDEIRO, 2009; FIGUEIREDO-JUNIOR et al., 2009; FILHO; JUNIOR; YAMAMOTO, 2010; MAPA, 2016; MONTEIRO, 2014; SILVA; ARAUJO, 2000).

Figura 1 - Distribuição da produção de caprinos no Brasil em 2014

Fonte: BARBOSA, 2016. Baseado no banco de dados do IBGE (IBGE, 2014).

1.2 Características gerais dos *Mollicutes*

Os micro-organismos da Classe *Mollicutes* não possuem parede celular, ao contrário das bactérias típicas, e são considerados os menores organismos de vida livre. São, portanto, resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos e sobrevivem à lise osmótica em ambientes isotônicos. Seus pequenos tamanhos coincidem com genomas reduzidos ou mínimos, entre 580 e 2.200 Kbp e com baixo conteúdo de G+C (24-33%), sob uma via de redução metabólica, o que torna esses micro-organismos nutricionalmente exigentes. Esses micro-organismos também se apresentam filogeneticamente relacionados às bactérias gram-positivas, tendo evoluído de bactérias gram-positivas ancestrais de forma degenerativa (reduativa) (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

A classe *Mollicutes* é composta por quatro ordens: *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* e *Anaeroplasmatales*. A ordem *Mycoplasmatales* é composta por duas famílias: *Mycoplasmataceae* e *Incertae sedis*. Por sua vez, a família *Mycoplasmataceae* é composta pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, os quais possuem mais de 200 espécies identificadas (BERGEY, 2010; RAZIN et al., 1998). Nesse texto, o termo mollicutes será designado como nome trivial para todos os membros dessa classe, e o termo micoplasma é referente ao nome trivial para todas as espécies do gênero *Mycoplasma*, como indicado por Bergey (2010). Micoplasmas são células pleomórficas com 300 - 800 nm de diâmetro. Quase todas as espécies crescem dentro do meio sólido, com 0,9% de ágar, formando colônias refringentes com a aparência de “ovo frito” se observadas em estereomicroscópio. A maioria das espécies requerem esteróis e ácidos graxos do meio de cultura para o crescimento. Ao contrário das bactérias típicas, não turvam os meios de cultura líquidos. Todas as espécies possuem a via respiratória do ciclo do ácido tricarboxílico incompleto, reduzindo sua capacidade de fosforilação oxidativa. Algumas espécies catabolizam a glicose para produzir ATP e, conseqüentemente, diminuem o pH do meio. Outras espécies não fermentativas hidrolisam a arginina e aumentam o pH do meio. Algumas outras espécies podem possuir ambas as vias, como *Mycoplasma fermentans*, e outras, nenhuma das vias, como *M. bovis*, sendo capazes de metabolizar piruvato ou lactato para a produção de ATP (BEAMAN; POLLACK, 1983; BERGEY, 2010).

Micoplasmas possuem certa especificidade aos hospedeiros e tecidos, provavelmente devido à sua exigência nutricional. Estas bactérias, em geral, preferem colonizar superfícies mucosas do trato respiratório e urogenital, olhos, glândulas mamárias e articulações (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). São capazes de infectar mamíferos, aves, répteis e peixes, podendo ser comensais ou atuar como agentes primários ou oportunistas variando os quadros e sinais clínicos. Conhecidos pela maior capacidade de estabelecer infecções crônicas do que as agudas, são de difícil controle e podem causar perdas econômicas importantes em animais de produção (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994)

Aproximadamente 40 micoplasmas podem colonizar ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos), sendo alguns patogênicos e outros oportunistas (CHAZEL et al., 2010). *M. mycoides* subsp *mycoides* “Small Colony” (MmmSC) e *M. bovis* são os principais patógenos bovinos. Em pequenos ruminantes, dentre os principais micoplasmas patogênicos, destacam-se *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, e *M. agalactiae*. Destes, três espécies provocam micoplasmoses de notificação obrigatória pela *World Organisation for Animal Health* (OIE) por possuírem importante impacto econômico: a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB), causada pelo *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC; a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) causada pelo *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*; e a Agalaxia Contagiosa (AC) causada por várias espécies de micoplasmas: *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* (AYLING et al., 2004; DAMASSA et al., 1992; LORIA et al., 2003; NICHOLAS, 2002; NICHOLAS et al., 2008). Em geral, as micoplasmoses mais importantes em pequenos ruminantes possuem alta morbidade e mortalidade (ALVES et al., 2013; DAMASSA; WAKENELL; BROOKS, 1992; DE AZEVEDO et al., 2006; KINDE et al., 1994).

1.3 Moléculas imunodominantes e fatores de virulência em micoplasmas

1.3.1 Lipoproteínas (LPP)

Micoplasmas possuem várias proteínas de membrana associadas a lipídeos (lipoproteínas) (LPPs). Essas LPPs de membrana são importantes antígenos dos molicutes e estão ancoradas na membrana citoplasmática, enquanto nas bactérias

gram-negativas estão ancoradas na membrana externa (figura 02). Ao contrário de bactérias com parede celular, que apresentam um menor número dessas moléculas, dois terços da massa da membrana dos micoplasmas correspondem às LPPs (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; YOU; ZENG; WU, 2006).

Figura 2 - Lipoproteínas em micoplasmas

Legenda: Figura esquemática comparativa da localização celular de lipoproteínas no envoltório de bactérias Gram-negativas e em micoplasmas. Micoplasmas não possuem parede celular e membrana externa. Nesses micro-organismos as lipoproteínas estão ancoradas no folheto externo da membrana plasmática. CW: parede celular; IMP: proteínas integrais de membrana; LG: lipoglicano; LPP: lipoproteína; LPS, lipopolissacarídeo; OM: membrana externa; PM: membrana plasmática; PMP: proteína periférica de membrana; PP: proteína periplasmática.

Fonte: CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999.

Estruturalmente, as lipoproteínas possuem dois ácidos graxos ligados a um resíduo amino-terminal de cistenil N-acilado ou não da cadeia de polipeptídeo (figura 3). Como nas bactérias gram-positivas e gram-negativas, LPPs de micoplasmas

podem ser triaciladas, entretanto, a ocorrência de lipoproteínas diaciladas é maior. Também tem sido evidenciado a ausência de acilação, provavelmente resultante da perda ou mutação do gene codificador da N-acetiltransferase. A presença de lipoproteínas diaciladas e triaciladas pode ocorrer em uma mesma espécie. A diferença nos padrões de acilação consiste em importante implicação para a interação desses micro-organismos e o ambiente, uma vez que lipoproteínas diaciladas podem estimular mais algumas respostas imunes do que proteínas triaciladas, uma vez que pode afetar o reconhecimento de diferentes *Toll-like receptors* (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; YOU; ZENG; WU, 2006).

Figura 3 - Estrutura química de lipoproteínas bacterianas

Legenda: Estrutura química do aminoácido terminal de lipoproteínas bacterianas ancoradas na membrana. A lipoilação do resíduo amino terminal cistênico é uma característica de todas as lipoproteínas de membrana bacteriana conhecidas. O grupo amino do resíduo cistênico é bloqueado em algumas lipoproteínas por uma terceira cadeia de ácido graxo.

Fonte: CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999.

Os mollicutes possuem apenas a presença da peptidase sinal II (SPase II), ao contrário da maioria das bactérias, as quais possuem dois tipos de peptidase sinal (I e II) (RAZIN; HERRMANN, 2002). SPase II são proteases ligadas à membrana as quais clivam proteínas após a translocação do interior para o exterior da célula (PAETZEL et al., 2002). A SPase II cliva a forma precursora, prolipoproteína, no resíduo de cisteína o qual torna-se o primeiro aminoácido da proteína processada (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Algumas LPPs importantes em *Mycoplasmas* spp. têm sido descritas, tais como: a LppQ em *M. mycoides subsp. mycoides* SC (ABDO; NICOLET; FREY, 2000); P60 em *M. capricolum subsp. capricolum* (ALBERTI et al., 2008) e P30 em *M.*

pneumoniae (VARSHNEY et al., 2008), dentre outras. Essas moléculas expostas à superfície bacteriana podem possuir as mesmas funções que proteínas periplasmáticas em gram-negativos. Várias LPPs de micoplasmas são importantes fatores de virulência e alvos de anticorpos inibidores de crescimento podendo apresentar diversas funções como, por exemplo apoptose (BAI et al., 2015), variação antigênica (CITTI; NOUVEL; BARANOWSKI, 2010; FERRIS et al., 1999), transporte (SCHMIDT; BROWNING; MARKHAM, 2007), atividade de nuclease (CACCIOTTO et al., 2013) e adesão (BELLOY et al., 2003; IVERSON-CABRAL; WOOD; TOTTEN, 2015).

1.3.2 Citoaderência

Apesar de possuírem simplicidade funcional e estrutural quando comparado com outras bactérias, micoplasmas são mais complexos do que se espera de um micro-organismo com genoma reduzido. De fato, as interações entre estes micro-organismos e o hospedeiro são resultado de algumas propriedades da membrana citoplasmática (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999). Desta forma, a ausência da parede celular nos *Mollicutes* também propicia a aderência bacteriana pelas adesinas de membrana com os receptores específicos das células hospedeiras. Esta aderência, em algumas espécies, permite a fusão da membrana bacteriana com a célula hospedeira, levando a transferência ou troca de componentes e acúmulo de produtos do metabolismo que podem causar danos oxidativos (RAZIN; JACOBS, 1992).

Em alguns micoplasmas a citoaderência é um dos principais fatores de virulência e diversas moléculas têm sido descritas como adesinas, dentre elas, algumas lipoproteínas como VlhA (lipoproteína variável de adesão à hemaglutinina A) em *M. synoviae* (BENCINA, 2002; KHIARI; MARDASSI, 2012), Vaa (adesina variável associada à aderência) em *M. hominis* (BOESEN et al., 2001) e Vlp (lipoproteína variável) em *M. hyorhinis* (XIONG et al., 2016). Outros micoplasmas, como *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae*, possuem uma extensão celular polar, denominada de “organela de adesão” (figura 4), a qual auxilia a adesão e motilidade por deslizamento (OPITZ; JACOBS, 1992; ROTTEM; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003; WAITES; TALKINGTON, 2004). Essa estrutura é composta por adesinas e proteínas acessórias de aderência que interagem para fornecer características estruturais e

funcionais (ROTTEM, 2003). *M. conjunctivae*, apesar de não possuir esta “organela”, também adere às células do hospedeiro por adesinas de superfície (BELLOY et al., 2003). Estudos anteriores mencionam que a ausência dessas proteínas não permite a citoaderência na célula hospedeira bem como a colonização no hospedeiro, além de serem imunogênicas (ROMERO-ARROYO et al., 1999; SVENSTRUP et al., 2002).

Figura 4 - Estrutura de adesão em *M. pneumoniae* estirpe M129

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a morfologia da estirpe selvagem de *M. pneumoniae* M129 contendo as proteínas P30 e P32. Seta branca indica a estrutura de adesão e seta preta indica um filamento que auxilia na movimentação. Barra: 1 mm.

Fonte: RELICH; BALISH, 2011, com adaptações.

A adesão ou proximidade de micoplasmas é necessária para produzir danos às células hospedeiras. *M. hyopneumoniae*, após contato com células epiteliais ciliadas *in vitro*, foi capaz de induzir citotoxicidade e diminuição da atividade ciliar e a perda de cílios (DEBEY; ROSS, 1994). De forma semelhante, *M. penetrans*, pela sua atividade de fosfolipase A1, causou danos na membrana de célula hospedeira (SALMAN; ROTTEM, 1995). As atividades citotóxicas por fosfolipases têm sido caracterizadas também em outros micoplasmas (KORNSPAN; ROTTEM, 2012; SHIBATA; SASAKI; WATANABE, 1995).

1.3.2 Invasão

A invasão bacteriana de células eucarióticas envolve um complexo processo que se inicia com a adesão (CHAUSSEE; COLE; VAN PUTTEN, 2000). A invasão de micoplasmas em células era pouco conhecida. Alguns micoplasmas possuem a capacidade de internalizar células não fagocíticas, como *M. bovis* (BÜRKI et al., 2015; VAN DER MERWE; PRYSLIAK; PEREZ-CASAL, 2010), *M. agalactiae* (HEGDE et al., 2015), *M. synoviae* (DUŠANIĆ et al., 2009) e *M. suis* (GROEBEL et al., 2009). Dessa forma ocorre a proteção bacteriana da resposta imune do hospedeiro, da ação de antibióticos (ROTTEM, 2003) e posterior disseminação do micro-organismo no hospedeiro (BÜRKI; FREY; PILO, 2015). Invasão e localização perinuclear de alguns mollicutes também têm sido descritas (MARQUES et al., 2010; UENO et al., 2008; WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000). *M. gallisepticum* de baixa passagem foi capaz de aderir e invadir células HeLa e fibroblastos de embriões de galinha, no entanto a estirpe de alta passagem apenas aderiu às células (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000).

1.3.3. Superantígenos

Superantígenos são potentes proteínas imunoregulatórias capazes de ativar linfócitos T de forma inespecífica, induzindo-os a secretar altos níveis de citocinas. Superantígenos possuem a característica de serem apresentados diretamente às e reconhecidos pelas células T sem o processamento por células apresentadoras de antígenos. Como o reconhecimento é dependente de poucos elementos, várias células T podem ser ativadas (ROTTEM, 2003; SHIO et al., 2014).

O superantígeno de *M. arthritidis*, denominado MAM, é o mais estudado em *Mollicutes*. Este micro-organismo causa poliartrite severa em roedores e já foi descrito infectando humanos (ATAEE et al., 2015). O MAM é capaz de estimular linfócitos murinos e humanos. Em camundongos, MAM, pode modular o sistema imune semelhantemente ao ocorrido em doenças autoimunes como a artrite reumatoide em humanos (COLE; ATKIN, 1991). Baseado na sequência linear e predição da estrutura secundária dessa molécula observou-se que esta não é filogeneticamente ou estruturalmente relacionada a outros superantígenos.

Entretanto, há evidências de pequenas regiões homólogas à domínios funcionais em superantígenos comuns (COLE et al., 1996).

1.3.4 Antígenos Variáveis de Superfície

A variação antigênica consiste na habilidade de uma espécie microbiana em alterar características antigênicas dos componentes de sua superfície incluindo flagelo, pili, proteínas de membrana e cápsula. Dessa forma, aumenta a possibilidade de colonização ao tecido hospedeiro e evasão do sistema imune facilitando o estabelecimento da infecção crônica (BROWNING et al., 2011; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Apesar da redução gênica dos micoplasmas, o número de genes envolvidos na diversificação de sua superfície celular é inesperadamente alta (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). A utilização de múltiplos genes variáveis organizados em famílias permite a geração de extensivo repertório de variação antigênica (ROTTEM, 2003). O mecanismo de diversidade antigênica através da variação de fase ou tamanho/sequência é caracterizado por ser reversível e por possuir alta frequência de eventos mutacionais que regularão a expressão e/ou a estrutura (variação de tamanho e/ou sequência) de cada membro de uma família multigênica (GLEW et al., 2000). Dessa forma, várias espécies de micoplasmas são capazes de modificar seus antígenos de superfície com alta frequência e assim, promover a diversidade gênica maximizando o potencial de um genoma limitado (BASEMAN; TULLY, 1997).

M. hyorhinis foi o primeiro micoplasma com relato de uma família gênica codificando lipoproteínas variáveis (Vlps). A família Vlp é composta por sete membros: VlpA, VlpB, VlpC, VlpD, VlpE, VlpF e VlpG. O sistema Vpl provém uma estratégia mutacional para gerar diversidade nas proteínas de superfície de *M. hyorhinis* permitindo evadir-se do sistema imune por meio da modulação de sua capacidade de aderência (CITTI et al., 2000; RAZIN; HERRMANN, 2002; XIONG et al., 2016). Entre as proteínas de variação de fase melhor estudadas em micoplasmas, destacam-se a lipoproteína VlhA, uma hemaglutinina, em *M. synoviae*. Após modificações pós traducionais, VlhA é clivada em MSPA e MSPB; dessas, apenas a porção C-terminal de MSPA está envolvida na hemadsorção e hemaglutinação (KHIARI; MARDASSI, 2012). De maneira semelhante, *M. bovis* possui altos níveis de variação dinâmica de antígenos, os quais pertencem à família

de variação de fase de lipoproteínas de superfície (Vsp). Na estirpe PG45, essa família é composta por 13 diferentes genes *vsp* de cópias únicas, organizados no locus-*vsp*. A co-expressão desses diferentes Vsps levam à características estruturais e antigênicas específicas (BÜRKL et al., 2015).

1.4 *Mycoplasma agalactiae* e a Agalaxia contagiosa

1.4.1 História e Impacto econômico

Agalaxia contagiosa (AC) tem sido relatada desde o século XIX. Em 1816, na Itália, a doença clínica foi descrita pela primeira vez, mas apenas em 1871 denominou-se de Agalaxia contagiosa. Em 1923, *M. agalactiae*, um dos principais agentes causadores da AC, foi cultivado e isolado pela primeira vez por J. Bridre e A. Donatien. Em 1931, foi inicialmente denominado *Anulomyces agalaxie* por Wroblewski. Em 1957, após mudanças na taxonomia de micoplasmas chamou-se o agente de *M. agalactiae*. Em estudos posteriores, outros micoplasmas foram também associados à doença, estabelecendo a agalaxia contagiosa de pequenos ruminantes como uma enfermidade de natureza multe etiológica (KUMAR et al., 2014; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

Rebanhos afetados com AC podem apresentar altas taxas de mortalidade e morbidade. A prevalência de animais com sinais clínicos em um rebanho pode ser de 30% a 60% e em animais jovens a mortalidade pode ser de 40-70%. Esses fatores associados à redução ou ausência da produção de leite, abortos, custos com diagnóstico, tratamento e prevenção podem causar perdas econômicas significativas. As perdas estimadas atingem cerca 30 milhões de dólares por ano em países europeus, principalmente em países com produção intensiva de ovelhas e cabras, tornando-se um importante problema de saúde animal (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001; NICHOLAS, 2002).

1.4.2 Etiologia

A AC é uma síndrome infecciosa multe etiológica em pequenos ruminantes, causada principalmente por *M. agalactiae*, responsável por mais de 80% das infecções (ADDIS et al., 2011; LORIA; NICHOLAS, 2013). Outros dois micoplasmas

podem causar AC mais frequentemente em cabras do que ovelhas: *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* (ASSUNÇÃO et al., 2006b; BARANOWSKI et al., 2010; BECKER et al., 2012; CHAZEL et al., 2010; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008). Alguns autores também correlacionam as infecções causadas pelo *M. putrefaciens* à AC (CHAZEL et al., 2010; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013), enquanto outros associam essas infecções à uma doença com manifestações clínicas e patológicas similares (KUMAR et al., 2014; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Além disso, co-infecções de diferentes espécies de micoplasmas também podem ocorrer (AMORES et al., 2011; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013).

1.4.2.1 *Mycoplasma agalactiae*

M. agalactiae é imóvel e possui entre 124-250 nm de diâmetro. Cresce em pH ótimo de 7,6 à 37 °C em meio enriquecido com soro animal que fornece o esterol, composto essencial para a síntese da membrana plasmática. Em meio sólido produz colônias de aparência típica de “ovo frito” (figura 5), e forma “películas e manchas” devido a reação ao soro de equino inativado por calor. Essa película é composta de colesterol e fosfolípidios e as manchas contêm sais de ácidos graxos os quais aparecem em torno das colônias. Este micoplasma cresce tanto em meio SP4 quanto em Hayflick suplementado com glicose. Apesar de não fermentar glicose nem hidrolisar ureia ou arginina, é sensível às alterações de pH (BERGEY, 2010; KUMAR et al., 2014). Além disso, este micro-organismo possui oito diferentes sorotipos (A - H) indicando alta variabilidade antigênica parcialmente relacionada com a origem geográfica dos isolados (BERGONIER et al., 1996). *M. agalactiae* é sensível à luz solar, radiação ultravioleta e inativado a 60 °C por cinco minutos e 100 °C por um minuto. É destruído por desinfetantes com princípio ativo, como: hidróclorido de potássio, formalina e cloroaminas (KUMAR et al., 2014).

Figura 5 - Crescimento de *M. agalactiae* em meio SP4

mycoide
caracter
vários a
metaból
similarid

M.
uem
ndo
cos,
o à
M.

agalactiae e o *M. bovis* possuem uma única espécie (RAZIN, 1996). O

Legenda: Colônias de *M. agalactiae* em meio SP4 visualizadas em estereomicroscópico. A: Colônias típicas em forma de “ovo frito”. B e C: Manchas e filmes, respectivamente, formados devido a uma reação do micro-organismo e o soro equino no meio de cultura (BARBOSA, 2016).

inibição de crescimento e imunofluorescência. Além disso, hidridização DNA-DNA tem revelado somente 40% de homologia entre *M. bovis* e *M. agalactiae* (PETTERSSON; UHLEN; JOHANSSON, 1996; RAZIN; HERRMANN, 2002).

Análises genéticas demonstraram que *M. agalactiae* pertence ao grupo filogenético hominis, assim como *M. bovis*, enquanto os outros membros que compreendem o “cluster mycoides” pertencem ao grupo filogenético spiroplasma. Além disso, o sequenciamento do genoma do *M. agalactiae* demonstrou que este possui um genoma pequeno de aproximadamente 880 Kpb. Ao ser comparado com outros mollicutes, *M. agalactiae* possui 18% dos genes transferidos horizontalmente ou adquiridos de micoplasmas do “cluster mycoides” que são filogeneticamente distantes apesar de compartilhar o mesmo hospedeiro. Este foi o primeiro relato de

transferência de genes em larga escala entre micoplasmas. Assim como outros micoplasmas, esse micro-organismo também possui um baixo conteúdo %GC (29,7%) e usa preferencialmente o códon UGA ao invés do UGG, como códon codificador de triptofano (SIRAND-PUGNET et al., 2007)

Acreditava-se que este micro-organismo fosse incapaz de penetrar nas células, apesar da sua capacidade de aderir ao epitélio colonizado (ADDIS et al., 2011). Entretanto, recentemente tem-se demonstrado a capacidade deste micoplasma em invadir *in vitro* diferentes células de ruminantes, dentre elas, células endometriais bovinas e fibroblastos de pulmão de búfalo (HEGDE et al., 2014) além de células primárias de ovelhas (células mamárias epiteliais e estromais; e células uterinas epiteliais e estromais). Porém, os mecanismos envolvidos na invasão do *M. agalactiae* ainda não foram elucidados (HEGDE et al., 2015).

M. agalactiae possui uma família de lipoproteínas codificada pelos genes *vpma*, os quais estão relacionados à variação de fase na expressão dessas proteínas pelo mecanismo *cut-and-paste* auxiliado por uma recombinase específica, Xer1, localizada próxima ao locus gênico *vpma*. Até o momento, tem-se descrito que a estirpe PG2 possui um único cluster de seis genes *vpma* e um único promotor, expressando assim um gene *vpma* por célula e um total de seis combinações gênicas. Ao contrário, a estirpe 5632 pode expressar duas *Vpma*s e no mínimo 91 combinações de *Vpma*, pois possui 23 genes *vpma* distribuídos em dois *clusters* separados, contendo um gene *xer1*, cada (CITTI; NOUVEL; BARANOWSKI, 2010; GLEW et al., 2000, 2002; NOUVEL et al., 2009). Tem-se descrito que a variação de fase relacionada à moléculas *Vpma* não são necessárias para o estabelecimento da infecção, mas pode influenciar na sobrevivência e persistência do patógeno, principalmente por aumentar a capacidade de disseminação e evasão do sistema imune do hospedeiro (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2012).

1.4.3 Epidemiologia

A agalaxia contagiosa, assim como a pleuropneumonia contagiosa bovina e pleuropneumonia contagiosa caprina, são classificadas pela World Organisation for Animal Health (OIE) como doenças de notificação obrigatória, pelo impacto econômico significativo na pecuária (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012; ASSUNÇÃO et al., 2007; BECKER et al., 2012). Essa doença

afeta pequenos ruminantes, de ambos os sexos, no mundo e possui impacto bastante descrito na caprinocultura da maioria dos países do Mar Mediterrâneo. Entretanto, *M. agalactiae* tem sido também relatado e isolado em outros países, como Índia, Austrália, Turquia, Irã, Jordânia, Mongólia, Nigéria, Senegal, Iraque, Bulgária, Sérvia, Sudão, Rússia, Estados Unidos e Brasil (AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008; ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012; CHAZEL et al., 2010; DE LA FE et al., 2005; KUMAR et al., 2014; LORIA et al., 2003).

Devido ao fato de ser considerada endêmica na região, diversos estudos sobre a AC têm sido realizados nos países banhados pelo mar mediterrâneo (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012). Na Espanha, foi relatada presença deste micro-organismo em *swab* auricular, sêmen e leite ao avaliar caprinos em centros de inseminação artificial, indicando a presença do micro-organismo em animais assintomáticos de programas de reprodução (AMORES et al., 2011). Mais recentemente, foi descrito também na Espanha, a alta prevalência de *M. agalactiae* em sêmens de carneiros assintomáticos naturalmente infectados (26,35%) (PRATS-VAN DER HAM et al., 2016) e em leite de ovelhas (36,8%) (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012). Resultados semelhantes também foram observados em outros estudos no mesmo país (DE LA FE et al., 2005, 2010). Na Espanha, após caracterização genômica por PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), VNTR (*multilocus variable number tandem-repeat*), e MLST (*multilocus sequence typing*) de *M. agalactiae* isolados de ovinos, foi demonstrado alta homogeneidade genômica dos isolados com a circulação de uma única população clonal endêmica (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2013). Resultado contrário foi observado um ano antes, no mesmo país, destacando-se alta diversidade genética dessa bactéria usando metodologia similar em isolados de caprinos sugerindo que estirpes diferentes colonizam hospedeiros diferentes nessa região (DE LA FE et al., 2012). Na França, a AC também é amplamente distribuída, mas ao contrário dos outros países mencionados, o principal patógeno infectando caprinos foi *M. mycoides* subs *capri* e não *M. agalactiae*. Entretanto, em ovelhas, *M. agalactiae* permanece endêmico (CHAZEL et al., 2010).

No Brasil, existem poucos estudos sobre a distribuição e prevalência de micoplasmas em pequenos ruminantes. Em 1942 ocorreu o primeiro relato de AC no

Brasil, no estado de São Paulo, entretanto micoplasmas não foram isolados (PENHA; D'APICE, 1942). Posteriormente, em 2004, houve a primeira descrição da detecção de *Mycoplasma spp.* em ovinos causando artrite, também em São Paulo, mas não foi possível a elucidação da espécie (GREGORY et al., 2004). Foi apenas em 2006 que se relatou pela primeira vez a ocorrência de Agalaxia contagiosa em rebanhos caprinos nacionais, provocada por *M. agalactiae*, no estado da Paraíba. O micro-organismo foi isolado do leite, exsudato das articulações, *swab* nasal e lavagem auricular. Foi descrito alta morbidade e mortalidade de até 100% (DE AZEVEDO et al., 2006). Posteriormente, Bandeira et al (2008), evidenciaram a presença desse micro-organismo também na Paraíba em 20% dos rebanhos de caprinos detectados por PCR em amostras de leite. Em Pernambuco, Alves et al., (2013) detectaram DNA de *M. agalactiae* em amostras de sêmen (17,9%), leite (3,7%) de caprinos naturalmente infectados e em amostras de sêmen congelados de centros de inseminação artificial (26,9%). Não foi evidenciado nenhum sinal clínico associado à AC nos animais, assim como, não havia alteração nas análises de qualidade, atividade e motilidade do sêmen, indicando um possível processo crônico ou doença subclínica (ALVES et al., 2013). Relatos de infecção congênita por *M. agalactiae* também têm sido notificados no país. Observa-se que as crias nascem com sinais clínicos de agalaxia contagiosa e são imunotolerantes (SILVA et al., 2014).

A frequência de *M. agalactiae* em animais selvagens também tem sido descritas, como em *Capra ibex* (CHAZEL et al., 2010) e *Capra pyrenaica*, na Espanha (GONZÁLEZ-CANDELA et al., 2006; VERBISCK et al., 2010; VERBISCK-BUCKER et al., 2008). Essas infecções representam risco para a densidade populacional, uma vez que, esses animais infectados constituem como reservatórios para micoplasmas patogênicos (KUMAR et al., 2014).

1.4.4 Transmissão da doença

M. agalactiae é estável à temperatura ambiente, característica que favorece a rápida disseminação por meio do contato entre animais infectados e animais suscetíveis. Além disso, animais jovens sem anticorpos maternos, fracos, debilitados, desnutridos, imunocomprometidos, animais sobre estresse de transporte e estresse fisiológico como prenhez e expostos a condições climáticas extremas são

mais susceptíveis à infecções. O contato com secreções auriculares, oculares, nasais, fezes, leite, urina e excreções de lesões articulares constituem as principais fontes de transmissão do micro-organismo (KUMAR et al., 2014). Transmissão sexual pelo sêmen infectado também pode ocorrer (ALVES et al., 2013; AMORES et al., 2011) e utensílios contaminados na ordenha também são fontes de infecção (KUMAR et al., 2014). A transmissão vertical através de colostro e leite contaminados também tem sido descritos (PATERNA et al., 2013).

Excreção do *M. agalactiae* no leite após oito anos da infecção em animais sem sinais clínicos ou com sinais clínicos leves também podem ocorrer. Dessa forma, a presença de animais portadores assintomáticos no rebanho constituem importante fonte de infecção. O gado, camelos e outros animais selvagens infectados também podem servir de reservatórios (CHAZEL et al., 2010; GONZÁLEZ-CANDELA et al., 2006; KUMAR et al., 2014; VERBISCK et al., 2010; VERBISCK-BUCKER et al., 2008).

Evitar a aquisição de animais infectados, realizar higienização adequada dos utensílios de ordenha e do ordenhador, separar animais jovens e isolar animais com sinais clínicos na propriedade são práticas que auxiliam a diminuição da transmissão de *M. agalactiae* entre os pequenos ruminantes (AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008).

1.4.5 Patogênese e sinais clínicos

O período de incubação de *M. agalactiae* em caprinos e ovinos varia de alguns dias à algumas semanas ou até dois meses dependendo da via de infecção, número e virulência do micro-organismo, e da imunidade do animal. Dependendo dessas condições, o agente etiológico pode causar doenças aguda, subaguda ou crônica (KUMAR et al., 2014). Em casos de primo-infecção, observa-se em animais infectados, inicialmente, febre devido à bacteremia. Após disseminação hematogênica, os micro-organismos podem atingir pulmões, nódulos linfáticos, olhos, glândulas mamárias e articulações promovendo vários sinais clínicos. Embora lesões pulmonares não tenham sido comumente observadas em casos de *M. agalactiae*, esse micro-organismo já foi isolado em surto de pleurisia em cabras. Infecções oculares podem levar a lesões severas de córnea, podendo acarretar em cegueira através da vascularização e ceratoconjuntivite. A infecção das glândulas

mamárias causa atrofia do órgão e diminuição ou supressão da produção de leite. A artrite é causada pelo inchaço doloroso e acúmulo de líquido sinovial principalmente nas articulações do carpo e do tarso. Em doenças crônicas há casos de ancilose (perda da motilidade da articulação). Infecções genitais estão relacionadas a abortos ou natimortos, principalmente devido a inflamações do útero. Vulvovaginite granular em fêmeas e inflamação testicular também têm sido descritos (KUMAR et al., 2014). Como reportado acima, formas assintomáticas também podem ocorrer, uma vez que se observou que o agente etiológico pode ser eliminado pelo leite e outros fluidos corporais por 12 meses a oito anos na ausência de sinais clínicos em caprinos (ADDIS et al., 2011; BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; COTTEW; LLOYD, 1965; DAMASSA; WAKENELL; BROOKS, 1992; GLEW et al., 2000; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

1.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da AC é baseado na presença de sintomas clínicos típicos relacionados à essa doença, entretanto, precisa ser confirmado por procedimentos laboratoriais. O diagnóstico definitivo para AC requer o isolamento do agente etiológico e sua identificação através de testes bioquímicos, sorológicos e moleculares a partir de amostras de leite, *swabs* auriculares e de conjuntiva, e fluídos articulares, como recomendado pela OIE (OIE, 2013), embora amostras de sangue (para isolar bactérias no estágio agudo da doença), *swabs* vaginais e amostras de tecidos *post mortem* (tecidos da glândula mamária, linfonodos ou pulmão) também podem ser analisadas (CORRALES et al., 2007). O primeiro teste a ser realizado após isolamento é a avaliação à sensibilidade à digitonina, o qual distingue micoplasmas de *Acholeaplasmas* spp. Em meio sólido, a característica de “películas e machas” diferenciam o *M. agalactiae* dos outros agentes etiológicos, assim como a atividade proteolítica de *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* em meios contendo caseína. No entanto, estas características bioquímicas são variáveis e têm pouca confiabilidade para o diagnóstico. Um teste bioquímico colorimétrico rápido baseado na atividade da esterase C8 de *M. agalactiae* também tem sido descrito, embora essa atividade seja encontrada também em *M. bovis*. A caracterização dos isolados por testes sorológicos é realizada para detecção de anticorpos nos soros dos animais por teste de fixação do

complemento, *imunoblotting* ou ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Estão disponíveis dois *kits* de ELISA comerciais para diagnóstico de infecções provocadas por *M. agalactiae*. Entretanto, no geral, não são testes sensíveis em infecções crônicas, possuem baixa sensibilidade à algumas estirpes, e fornecem resultados variados de acordo com a espécie hospedeira e origem geográfica das amostras. Ensaio de PCR convencional e PCR em Tempo Real são utilizados por serem extremamente sensíveis embora resultados negativos não devem ser considerados definitivos e resultados positivos em áreas consideradas livres da agalaxia contagiosa devem ser confirmadas por isolamento, caracterização bioquímica e sorológica. Contudo, de acordo com a OIE, a ausência da disponibilidade de testes de diagnósticos em alguns países indicam que a agalaxia contagiosa seja sub notificada (KUMAR et al., 2014; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008; OIE, 2013; POUMARAT et al., 2012).

1.4.7 Vacinas: Prevenção e controle

A terapia antimicrobiana está entre as principais formas para o controle da AC e consiste, principalmente, em fluoroquinolonas, tetraciclina e macrolídeos. Entretanto, durante o tratamento torna-se necessário um período de retenção do animal que resulta em perdas na produção de leite. Além disso, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite constitui-se em risco na qualidade de fermentação bacteriana na produção de queijo. E apesar da susceptibilidade de *M. agalactiae* à fluoroquinolonas e sua boa penetração nos tecidos, estes antibióticos não são capazes de eliminar o patógeno do canal auditivo externo de animais afetados, além de provocar a imobilidade de espermatozoides. Dessa forma, se a dose terapêutica não é exatamente definida e o antibiótico não é administrado por um período suficientemente longo, o efeito terapêutico pode ser mínimo ou nenhum. Os agentes etiológicos da AC continuam a ser disseminados no ambiente e há a possibilidade da ocorrência de estirpes resistentes (ASSUNÇÃO et al., 2006a; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013; LORIA et al., 2003; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Devido as desvantagens da terapia antimicrobiana as vacinas são alternativas no controle da agalaxia contagiosa.

As estratégias de vacinação contra AC em ovinos e caprinos são baseadas em vacinas atenuadas ou inativadas. As vacinas atenuadas de culturas de *M.*

agalactiae são mais eficazes do que as vacinas inativadas, mas seu uso não é permitido em todos os países afetados pela AC. Com a administração de vacina atenuada em animais infectados ocorre a normalização da lactação e as lesões articulares diminuem, mas os patógenos continuam a ser excretados pelo leite por vários meses. Se os animais saudáveis são vacinados preventivamente, não há infecção generalizada e desenvolvimento de sinais clínicos, mas pode ocorrer a infecção temporária do úbere. As vacinas inativadas não possuem as desvantagens mencionadas, mas a resposta imune é baixa a ponto de serem utilizadas apenas ocasionalmente (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Vacinas comerciais contra *M. agalactiae*, inativadas com formalina, são amplamente utilizados no Sul da Europa, enquanto vacinas atenuadas são utilizadas na Turquia, mas existem poucos dados para avaliar a sua eficácia (NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008). Os melhores resultados clínicos com vacinas inativadas têm sido observados na presença de saponina como adjuvante (LORIA et al., 2003; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008; TOLA et al., 1999).

Vacinas inativadas combinadas com dois agentes etiológicos da AC (*M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *capri*) também têm sido avaliadas. Nesse relato, formaldeído ou fenol foram usados como agentes inativantes e hidróxido de alumínio e saponina foram usados como adjuvantes. Anticorpos contra os micro-organismos avaliados foram detectados após sete meses da imunização em cabras lactantes, mas melhores resultados foram observados em vacinas inativadas pelo fenol (DE LA FE et al., 2007b). Em estudo similar foi evidenciado que hidróxido de alumínio associado com saponina e inativação com formaldeído atenua sinais clínicos da agalaxia contagiosa mas não previne infecções por *M. agalactiae*. Entretanto, nesse estudo, não foi observado nenhuma espécie de micoplasma sendo liberada pelo leite após a imunização (DE LA FE et al., 2007a).

Em ovelhas, os resultados são variados. Vacinas vivas e inativadas foram administradas em animais lactantes e foi observado que a vacina inativada com formalina não preveniu os sintomas, entretanto a doença desenvolvida não foi igualmente severa comparando-se com animais não vacinados (FOGGIE et al., 1971). Posteriormente, foi relatado que vacinas inativadas com saponina e fenol fornecem melhores resultados na proteção da infecção contra *M. agalactiae*, em ovelhas (TOLA et al., 1999). Resultado promissor também foi observado em vacinas emulsionadas em óleos minerais como adjuvantes (BUONAVOGLIA et al., 2008).

Ao avaliar a resposta imune desenvolvida contra *M. agalactiae* inativado com formalina associado a diversos adjuvantes diferentes em camundongos foi demonstrado que o ácido polinosínico – policisdílico foi o adjuvante mais eficiente em promover resposta mediada por Th1. Demonstrando assim, uma possível maneira de melhorar as vacinais disponíveis (AVRAMIDIS et al., 2002)

No Brasil, não há vacinas comerciais e regulamentação quanto ao seus usos na prevenção da agalaxia contagiosa. Nesse intuito, um estudo nacional, avaliou a eficácia de vacinas oleosas e aquosas comerciais europeias em cabritos. A primeira foi capaz de induzir níveis mais elevados e duradouros (de no mínimo sete meses após a administração da primeira dose) quando comparada com a segunda (ALCÂNTARA et al., 2013).

A vacinação é considerada adequada em regiões endêmicas e em áreas com baixo padrão social e econômico. Nesses países o desenvolvimento de vacinas de nova geração contra agalaxia contagiosa são necessárias (MADANAT, ZENDULKOVÁ, POSPÍSIL, 2001). Espera-se que uma nova geração de vacinas recombinantes nos próximos anos proporcione melhor proteção contra micoplasmas, especialmente contra as infecções por *M. agalactiae* (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013).

1.4.7.1 Vacinologia Reversa

Nas últimas décadas a área de vacinologia avançou bastante principalmente pela tecnologia do DNA recombinante que auxilia no desenvolvimento de vacinas de subunidades baseadas em antígenos específicos. Inicialmente, identificam-se os fatores importantes na patogênese e imunidade e então, os fatores identificados são produzidos em maior quantidade. Os avanços na tecnologia genômica também permitiram o desenvolvimento de vacinas. A disponibilidade de genomas completos e avanços na biologia molecular permitem que cada possível antígeno de um patógeno possa ser avaliado quanto a habilidade de induzir uma resposta imune protetora (ADU-BOBIE et al., 2003).

A vacinologia reversa melhorou as vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B com base em proteínas conservadas, por exemplo. As novas vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B possuem ampla cobertura, incluindo proteção para estirpes que não são do sorogrupo B (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016). Da mesma forma, vacinas conjugadas contra *Haemophilus*

influenzae tipo b (Hib) possuem grande impacto na redução de crianças infectadas (SWINGLER; MICHAELS; HUSSEY, 2007).

Em micoplasmas, as proteínas integrais e associadas a membrana estão expostas ao ambiente que esses micro-organismos se encontram e desempenham importante papel na sobrevivência e patogênese do agente. Estas proteínas são antigênicas e podem proporcionar novos alvos para o desenvolvimento de vacinas e terapia (CACCIOTTO et al., 2010). Peptídeos sintéticos são alternativas vacinais interessantes; são seletivos, possuem curtas sequências de aminoácidos conhecidos com epítomos, e são mais estáveis no armazenamento e transporte, características favoráveis na veterinária (SANTONA et al., 2002). Neste contexto, diversas proteínas recombinantes de membrana estão sendo estudadas e sugeridas como possíveis alvos na prevenção de infecções de *M. hyopneumoniae* (GALLI et al., 2012, 2013; JORGE et al., 2014; LEE et al., 2014; MARCHIORO et al., 2014a, 2014b); *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (HAMSTEN et al., 2008); *M. genitalium* (LI et al., 2010); *M. ovipneumoniae* (LI et al., 2011); *M. haemofelis* (MESSICK; SANTOS, 2011); *M. pneumoniae* (SCHURWANZ; JACOBS; DUMKE, 2009); *M. gallisepticum* (YOSHIDA et al., 2000).

Especificamente em *M. agalactiae*, poucos antígenos de membrana foram identificados como imunogênicos e estão sendo estudados como potenciais alvos para o controle da AC. A proteína P30 consiste em um antígeno imunodominante, expresso nos sorotipos A a D de *M. agalactiae*, que induz resposta imune inicial intensa e persistente em animais infectados (FLEURY et al., 2001). A citoadesina P40, também é caracterizada como fortemente imunogênica, com indução de anticorpos no início da infecção em ovelhas. É expressa por todos os sorotipos, exceto o sorotipo C (FLEURY et al., 2002). A proteína P48 induziu significativa resposta imune em camundongos imunizados sendo considerado também um importante antígeno imunodominante (CHESSA et al., 2009; ROSATI et al., 1999). A lipoproteína MAG_5040 tem sido caracterizada como uma proteína antigênica com atividade de nuclease potencialmente envolvida na patogenicidade de *M. agalactiae* (CACCIOTTO et al., 2013). Entretanto, apesar do progresso nos estudos sobre métodos terapêuticos e de prevenção, estratégias preventivas ainda permanecem ineficientes no controle da AC. Dessa forma, a determinação de mais alvos antigênicos e consequente geração de uma nova alternativa vacinal que proporcione melhor proteção contra infecções por *M. agalactiae* são ainda necessárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Identificar, clonar, purificar e caracterizar proteínas recombinantes possivelmente antigênicas de *M. agalactiae*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e selecionar proteínas de membrana de *M. agalactiae* possivelmente antigênicas por bioinformática;
- Avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes purificadas selecionadas, por *Western blotting*, utilizando soros de caprinos naturalmente infectados pelo *M. agalactiae*.

3 METODOLOGIA

3.1 Análise *in silico* de *Mycoplasma agalactiae*

Sequências de DNA codificantes (CDS) de *M. agalactiae*, estirpe PG2 (número de acesso no GenBank: NC_009497.1), foram analisadas pelos *web-software* PSORTb versão 3.0.2 (NAKAI, HORTON, 1999; YU et al., 2010), TOPCONS versão 2.0 (TSIRIGOS et al., 2015), TopPred versão 1.10 (CLAROS; VON HEIJNE, 1994), TMHMM Server versão 2.0 (KROGH et al., 2001; SONNHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998), DAS (CSERZO et al., 2002), JPred 4 (DROZDETSKIY et al., 2015) para avaliar a sua localização celular (extracelular, transmembrana, citoplasmática) e predições de estruturas secundárias. CDSs de proteínas transmembrânicas e proteínas secretadas foram selecionadas e analisadas pelo *web-software* IEDB Analysis Resource (*Immune Epitope Database and Analysis Resource*) versão 2.13.1. No IEDB, por sua vez, foi possível avaliar predições das CDSs para regiões com *beta-turn* (CHOU, FASMAN, 1978), acessibilidade (EMINI et al., 1985) e predição de epítomos lineares para células B (através do Bepipred) (ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006; LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006; PONOMARENKO; BOURNE, 2007). Para as predições de *beta-turn* e acessibilidade foi utilizado o *threshold default* de 1,0. Para a predição de epítomos lineares de células B (usando o método do Bepipred) o *threshold* utilizado foi de 0,8 para evitar falsas predições. Para todas as predições utilizou-se uma janela de sete aminoácidos. Predição de epítomos conformacionais foram realizados através do *web software* CBTPE (*Conformational B-cell Epitope Prediction*) utilizando os parâmetros *default* (ANSARI; RAGHAVA, 2010). Foram excluídas desse estudo, proteínas que possuíam mais de cinco triptofanos codificadas pelo códon TGA (uma vez que este códon atua como terminador em *Escherichia coli* e como codificador de triptofano em micoplasmas) e proteínas descritas na literatura como antigênicas, como a P48 (ROSATI et al., 2000), P30 (FLEURY et al., 2001) e P80 (TOLA et al., 2001), com exceção da proteína P40 (WP_011949418.1) (FLEURY et al., 2002) a qual foi usada como controle positivo para os ensaios de antigenicidade. Proteínas selecionadas como antigênicas por estes *web software* foram então analisadas usando BLAST e DELTA BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar regiões de homologia com proteínas de

outras bactérias e alinhamento das regiões homólogas foram geradas com Clustal Omega (LI et al., 2015; MCWILLIAM et al., 2013; SIEVERS et al., 2011). O programa SAPS (Statistical Analysis of Protein) (BRENDDEL et al., 1992; GOUJON et al., 2010; LI et al., 2015; MCWILLIAM et al., 2013) foi utilizado para avaliar propriedades das sequências, como *clusters* de aminoácidos únicos ou repetitivos e espaçamento anormal entre resíduos idênticos, usando os parâmetros *default*. Para avaliar características físico-químicas das proteínas foi utilizado o programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005). Por fim, para identificação e agrupamento de famílias gênicas de parálogos foi utilizado BLASTClust (70% de cobertura e 30% de identidade) (ALVA et al., 2016).

3.2 Estirpe bacteriana e condições de cultivo

A estirpe de *M. agalactiae* (GM 719) foi cedida pelo professor Drº Elmiro Rosendo do Nascimento da Universidade Federal Fluminense. O micro-organismo foi inicialmente cultivado em 2 mL de meio SP4 a 37 °C e expandido para 10 mL do caldo. Na fase de crescimento logarítmico (com base em mudança colorimétrica), a cultura foi centrifugada a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C, o *pellet* foi homogeneizado em 2 mL de PBS e a suspensão foi armazenada a -20 °C até a extração do DNA.

3.3 Extração de DNA do *M. agalactiae* e amplificação da região de interesse para confirmação da estirpe

A extração de DNA do micoplasma foi realizada pelo método de sílica (BOOM et al. 1990), com modificações. Adicionou-se 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4; EDTA 0,5M, pH 7,0; isotiocianato de guanidina 4 mM) e 40 µL de suspensão de sílica a 700 µL da suspensão de micoplasma armazenada. Em seguida homogeneizou-se a suspensão e manteve-se em repouso por 10 minutos. Esta suspensão, depois, foi centrifugada a 20.000 x g por 4 minutos, removendo-se o sobrenadante. O sedimento foi homogeneizado com 500 µL de tampão de lavagem (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4; isotiocianato de guanidina 4 mM) por 30 segundos e centrifugado a 20.000 x g por 4 minutos (esta etapa foi repetida duas vezes). O sobrenadante foi removido e o sedimento homogeneizado com 500 µL de etanol

70% gelado e centrifugado a 20.000 x g por 4 minutos. O sedimento foi novamente homogeneizado com 500 µL de acetona gelada e centrifugado a 20.000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi removido e após total desidratação do *pellet* adicionou-se 120 µL de água Milli – Q e homogeneizado. A solução foi incubada por 10 minutos a 56 °C, centrifugada a 20.000 x g por 10 minutos. Por fim o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20 °C até a realização da PCR.

A amostra foi submetida à PCR específica para confirmação da espécie *M. agalactiae* (CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 1995). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1. A reação de PCR possuía Tampão 1X (*Buffer*) (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl), 50 pmols de cada iniciador, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1,0 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 µL. Água ultra pura foi utilizada como controle negativo. As condições de ciclagem ocorreram na temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos com *hold step* a 4 °C. Os produtos das PCRs foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz ultravioleta após a adição de brometo de etídio a 0,5 µg/ mL.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para identificação de *M. agalactiae*

Iniciadores	Sequência (5'→3')	Ta (°C) ^a	Referência
Maga-1	CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG	58,0	CHÁVEZ-GONZÁLEZ et al., 1995.
Maga-2	CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C		

Nota: ^a Ta (°C): Temperatura de anelamento dos iniciadores em graus Celsius.

3.4 Desenho de iniciadores e amplificação das CDSs selecionadas

Os iniciadores para amplificação das CDSs selecionadas foram concebidos com base na sequência nucleotídica genômica do *M. agalactiae* PG2 depositada no GenBank sob número de acesso NC_009497.1 e com o auxílio dos *web-sofware*s Reverse Complement (STOTHARD, 2000) e IDT *Oligo Analyzer* (Integrated DNA Technologies). Para permitir a clonagem direcional, foram desenhados *primers forward* contendo a sequência CACC na extremidade 5' do iniciador, uma vez que

esses 4 nucleotídeos parearão com a sequência GTGG no vetor pET TOPO®. Os iniciadores gerados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Identificação das CDSs selecionadas, oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento

N°	N. de acesso no GenBank	Provável função	Sequência (5' → 3')	Ta (°C) ^a	Amplificado ^b	Quantidade de códon TGA
1	WP_011949419.1	Proteína hipotética	<u>cac c</u> AT GAA AAA AGT AAA ATT A TTA ATT TTC CTT GTT ATT TTT CAT	51,0	Sim	-
2	WP_011949418.1 ^d	P40, Lipoproteína	<u>cac c</u> AT GAA AAC AAA TAG AAA AAT TTA AAA CTC AAT TAA TGA ATC TTT	52,0	Sim	1
3	WP_011949336.1 ^d	Lipoproteína	<u>cac c</u> AT GAA CAA AGT AAA TAA TTA TTT CTT GTT TAG CTT TTT GA	-	NA	3
4	WP_011949770.1 ^d	Proteína hipotética	<u>cac c</u> AT GAA ATC TAA ATT TTT AA CTA TTT TGC TTT TAA TTT AGT CTC	52,0	Sim	2

Notas: ^a Ta (°C): Temperatura de anelamento dos iniciadores em graus Celsius.

^b (NA): Região não amplificada.

^c CACC: Sequência de nucleotídeos adicionada para clonagem direcional no vetor Champion pET 200D/TOPO His-Tag (Invitrogen).

^d CDSs que foram submetidas à síntese comercial.

Para a amplificação das CDSs por PCR, inicialmente utilizou-se a Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) para padronização e confirmação da sequência alvo na estirpe. Em seguida, foi realizada outra reação de amplificação utilizando uma polimerase termoestável com atividade *proofreading*. A reação de PCR possuía Tampão 1X (*Buffer*), 50 pmols de cada iniciador, 1,0 U de Platinum® Pfx DNA Polimerase (Invitrogen™), 1,0 mM de MgSO₄, 200 µM de dNTPs, 2,5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 µL. PCRx *Enhancer Solution* 0,5 x foi utilizado quando necessário. Água ultra pura foi utilizada como controle negativo. As condições de ciclagem ocorreram na temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento dependente da sequência por 1 minuto, 68 °C por 2 minutos e um ciclo final de 68 °C por 10 minutos com *hold step* a 4 °C. Os produtos das PCRs foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz ultravioleta após a adição de brometo de etídio 0,5 µg/ mL.

3.5 Clonagem e transformação

Apesar de três sequências terem sido amplificadas, seguiu-se com a clonagem apenas da sequência WP_011949419.1. Para as outras sequências, três vetores de expressão pET-28a(+) com sítio de resistência a canamicina e contendo as sequências codificadoras das proteínas WP_011949418.1, WP_011949336.1 ou WP_011949770.1 foram sintetizados pela GenScript (Piscataway, EUA). Essas três CDSs contém pelo menos um códon TGA específico de micoplasmas como códon codificador do aminoácido triptofano o qual é reconhecido em *E. coli* como códon de terminação. Dessa forma, códons TGA foram alterados para TGG (códon codificador de triptofano) na sequência de DNA enviada para síntese.

Para clonagem da sequência WP_011949419.1, após visualização dos produtos da PCR, o DNA desta foi purificado a partir do gel de agarose 1% utilizando o *kit* QIAquick *Gel Extraction* (Quiagen®) seguindo as recomendações do fabricante. A sequência purificada foi ligada no vetor pET TOPO® de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™). Para a reação foram adicionados 4 µL de produto da PCR, 1 µL de solução salina e 1 µL do vetor TOPO®. A reação foi homogeneizada e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi resfriada em gelo e prosseguiu-se para transformação de células One

Shot® TOP10 competentes. Para isso, 3 µL da reação de clonagem TOPO® foram misturados suavemente com *E.coli* One Shot TOP10 quimicamente competentes e incubadas em gelo durante 30 minutos, seguido por choque térmico durante 30 segundos a 42 °C. As células foram transferidas imediatamente para o gelo e 250 µL de meio S.O.C foram adicionados. A solução foi agitada a 200 rpm a 37 °C durante 1 hora. 100-200 µL de cada transformação foram plaqueadas (em meio Luria Bertani contendo 100 µg/mL de canamicina) e incubada a 37 °C, *overnight*. Colônias foram selecionadas e sub-cultivadas a 200 rpm a 37 °C, *overnight*. Para analisar os transformantes e confirmar a presença do inserto foram feitas PCRs utilizando iniciadores adequados para a sequência clonada. A reação foi incubada durante 10 minutos a 94 °C para lisar as células e inativar nucleases. Os produtos de PCRs foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1% sob luz ultravioleta após a adição de brometo de etídio 0,5 µg/ mL. Plasmídeos contendo o inserto de interesse foram extraídos por lise alcalina das células seguido por adsorção em sílica, para tanto foi utilizado o *kit* comercial QIAprep Spin Miniprep (Quiagen®) de acordo com as instruções do fabricantes.

A identidade da inserção foi determinada por sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, em ambas as direções, utilizando iniciadores T7 e T7 *reverse* (tabela 3). As amostras amplificadas e purificadas foram enviadas ao Instituto de Biologia (IB-USP), Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-tronco. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o ABI 3730 DNA Analyser, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). As sequências foram analisadas pelo *software* Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados no sequenciamento

Iniciadores*	Sequência (5' ➔ 3')
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 <i>reverse</i>	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG

Nota: (*) Iniciadores fornecidos pelo *kit* *Champion™ pET Directional TOPO® Expression* (Invitrogen).

3.6 Expressão proteica

E. coli BL21 Star™ (DE3) One Shot foram utilizadas para expressão proteica. Um total de 10 ng do DNA do plasmídeo foram transformados em 50 µL de células BL21 Star™ (DE3) One Shot utilizando procedimento de transformação semelhante ao descrito acima. Plasmídeo e BL21 Star foram homogeneizados delicadamente e incubados em gelo durante 30 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico durante 30 segundos a 42 °C sem agitação e transferidas imediatamente para o gelo. Um total de 250 µL de meio S.O.C foram adicionados e incubados a 37 °C durante 30 minutos com agitação (200 rpm). Na reação de transformação foram adicionados 10 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado e incubados *overnight* a 37 °C com agitação.

Em seguida, 50 mL de LB foi incubado com 500 µL da cultura descrita anteriormente, a 37 °C com agitação, até a densidade óptica (DO₆₀₀) maior que 0,600. Em seguida uma alíquota de aproximadamente 1 mL desta cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O *pellet* desta suspensão foi armazenado a -20 °C até o momento do uso, essa alíquota refere-se ao tempo zero. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG para a concentração final de 0,5-1 mM. As culturas cresceram *overnight*, em agitação a 18 °C. Após o fim da incubação foi retirado outra alíquota de aproximadamente 200 µL, a qual foi centrifugada nas mesmas condições, essa alíquota refere-se ao tempo *overnight*. O restante da cultura foi centrifugado e o *pellet* foi homogeneizado em tampão 0,1M Tris, 0,5M NaCl, 10% glicerol pH 8,5 ou tampão 20mM fosfato, 0,5M NaCl, 10% glicerol. As células foram lisadas por sonicação por um minuto e trinta segundos, pulso de 10" *on* e 15" *off*, amplitude 35% (*Digital Sonifier® Cell Disruptor*, Branson, VWR Scientific). As amostras foram centrifugadas e o *pellet* homogeneizado em tampão 0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, 8 M ureia, correspondendo à fração insolúvel, enquanto o sobrenadante corresponde à fração solúvel. Todas as frações foram armazenadas a -20 °C até a realização do SDS-PAGE e *Western blotting*.

3.7 Análise das frações solúveis e insolúveis de *E. coli* recombinante

Cada fração celular de *E. coli* (30 µL) foi homogeneizada em 20 µL de tampão de amostra de SDS-PAGE 2X, fervido por 5 minutos. As amostras (10 µL de cada) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% SDS (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10%; acrilamida/bisacrilamida 30%/0,8%; persulfato de amônio 10%; N, N, N',

N'-tetrametilinediamina) e submetido a eletroforese com tampão específico (Tris 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1%). Incluiu-se no gel padrão de peso molecular para estimar o peso molecular das proteínas recombinantes purificadas. Após eletroforese, as proteínas foram reveladas com solução de *Comassie blue* (10% ácido acético, 40% metanol, 1% de *Comassie blue*).

As amostras também foram avaliadas quanto a presença de poli-histidina N-terminal, por meio de *Western Blotting*. A transferência ocorreu em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad™), por 1 hora e 30 minutos e amperagem de 500 mA, em tampão de transferência (25 mM tris, 192 mM glicina, 20% vol/vol metanol, pH 8,3). Após transferência a membrana foi tratada com PBS (Tampão de fosfato-salino) - Tween 20 0,05% e 3% de leite desnatado por duas horas. Em seguida a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 0,05% e o anticorpo primário 6x-His *Epitope Tag* (Invitrogen™) diluído (1:3000) foi adicionado e incubado por duas horas em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada e o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*anti-mouse IgG*, HRP *conjugate* - Invitrogen™) foi adicionado e incubado por mais duas horas em temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi revelada usando o *kit Amersham ECL Western blotting detection* (GE Healthcare™).

3.8 Extração e purificação proteica

Para purificação proteica, inicialmente foi realizado o pré-inóculo em 10 mL de meio LB com antibiótico e 100 µL da cultura de *E. coli* contendo o vetor de interesse e incubados *overnight* a 37 °C com agitação (200 rpm). Em seguida, 1 L do meio LB foi inoculado com 10 mL da cultura anterior a 37 °C com agitação (200 rpm) por 2-3 horas. Foi adicionado IPTG 1 mM para induzir a expressão e novamente incubado a 37 °C com agitação, *overnight*. As células foram obtidas por centrifugação (10.000 x g, 10 minutos a 4 °C). O *pellet* foi homogeneizado em 200 mL do tampão apropriado contendo inibidor de proteases (0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, 10% glicerol pH 8,5 ou 20 mM fosfato, 0,5 M NaCl, 10% glicerol, pH 7,0 e 1 mM PMSF) e submetido à lise mecânica (600 psi por 15 minutos) em um homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS, Brasil). A amostra lisada foi centrifugada a 14.000 x g por 1 hora, a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana 0,22 µm.

Finalmente, à solução filtrada foi adicionado 20 mM de imidazol e, prosseguiu-se a purificação com auxílio de bomba peristáltica (Watson Marlon sci 323). A presença do marcador de poli-histidina N-terminal (6xHis) nos vetores permitiram a purificação da proteína recombinante com uma resina quelante de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA) sobre condições adequadas (tampão de equilíbrio; e tampão de eluição: 0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, 10% glicerol pH 8,5 ou 20 mM tampão fosfato, 0,5 M NaCl, 10% glicerol, pH 7,0, 50 – 500 mM imidazol) e posteriormente, as frações cromatográficas foram visualizadas em SDS-PAGE.

As frações cromatográficas isoladas, contendo a proteína recombinante, foram submetidas à diálise em membrana (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 35 mm, Thermo Scientific™). A solução tampão utilizada foi a mesma utilizada na purificação com a ausência de imidazol. A diálise foi realizada *overnight* a 4 °C.

3.9 Quantificação de proteínas

A determinação da concentração das proteínas purificadas foi realizada através de quantificação de proteínas totais pelo método BCA com detecção colorimétrica, para tanto foi utilizado o *kit* Pierce BCA *Protein Assay* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.10 Ensaios de antigenicidade

3.10.1. Amostras de soro caprino

Amostras utilizadas no presente estudo foram provenientes de caprinos (n=8) com sinais clínicos de AC e cedidos por um produtor de caprinos da região sudoeste da Bahia (propriedade A). Adicionalmente, soros coletados de caprinos da mesma região (propriedades B - J), em projeto anterior desenvolvido pelo Laboratório de Micoplasmas (n=28), foram também utilizados. A caracterização desses animais estão descritos no apêndice A.

Amostras de soro selecionadas para ensaios de *Western blotting* como explicado abaixo foram misturadas (*pooled*) (n=5) e purificadas contra antígenos de *E. coli*. As 8 amostras da propriedade A também foram purificadas, individualmente, para utilização no teste de ELISA. Para isso, 500 µL de cada soro reativo foi homogeneizado com PBS - Tween 20 (0,05%) e 3% de leite desnatado, diluídos na proporção 1:20 e submetidos a purificação contra antígenos desnaturados e sonicados de *E. coli* BL 21 (DE3), por 20 horas em agitação (GUIMARÃES et al., 2014).

3.10.2 Extrato total de *M. agalactiae* GM 719

M. agalactiae GM 719 foi cultivado em 500 mL de meio SP4, centrifugado por 30 minutos, 20.000 x g. O *pellet* foi lavado três vezes com PBS e homogeneizado em 5 mL de PBS, por fim, a solução foi submetida à lise por sonicação por um minuto e trinta segundos, pulso de 10" *on* e 15" *off*, amplitude 35%. Proteínas totais foram dosadas usando nanoespectrofotômetro (com comprimento de onda à 280 nm), (DS-11+ Denovix, Uniscience).

3.10.3 ELISA Indireto (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para seleção de amostras reativas à proteína recombinante P40

Para selecionar soros de animais com anticorpos para *M. agalactiae*, ELISA indireto com a proteína P40 recombinante, sabidamente antigênica (FLEURY et al., 2002), foram inicialmente realizados com as amostras (n=36) descritas acima. Soros altamente reativos (D.O. > 0,700) contra a proteína recombinante foram então utilizados para avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes produzidas por meio de *Western blotting* e ELISA indireto. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de poliestireno (COSTAR®) sensibilizadas utilizando 200 ng/ poço da proteína recombinante P40 diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por 16 horas a 4 °C, em câmara úmida. Em seguida, a placa foi lavada cinco vezes com PBS - Tween 20 (0,05%). Ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS contendo 10% de leite desnatado por uma hora a 37 °C. Após lavagem das placas com PBS - Tween 20 (0,05%) as amostras de soro do animais, diluídas 1:100 em PBS contendo 5% de leite desnatado, foram adicionadas e as placas foram

incubadas a temperatura ambiente por uma hora. Então as placas foram lavadas novamente e adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*Rabbit anti-Goat IgG*, HRP *conjugate* - Invitrogen™), diluído 1:2.000 em PBS contendo 5% de leite desnatado. Após incubação em temperatura ambiente por uma hora as placas foram lavadas mais uma vez. As reações foram reveladas com o substrato cromógeno OPD (*o-Phenylenediamine Dihydrochloride*) com a adição de peróxido de hidrogênio, por 15 minutos. A reação foi parada com 50 µL da solução de ácido sulfúrico 1 N. A leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada em filtro de 492 nm em leitor de ELISA (Asys Expert Plus). As amostras e controles de *background* (reação sem o antígeno ou sem o anticorpo primário) foram avaliados em duplicata.

3.10.4 Western blotting

Para avaliar a imunorreatividade de proteínas recombinantes de *M. agalactiae*, ensaios de *Western blotting* foram realizados. Para tanto, um *pool* (n=5) de soros purificados positivos contra proteína P40 no ELISA, como descrito acima, foi utilizado. As proteínas recombinantes foram submetidas ao SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose como descrito anteriormente. Em seguida a membrana foi lavada com PBS - Tween 20 (0,05%) e o *pool* de soro purificado dos animais (diluição 1:20) foi adicionado e incubado por duas horas em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada e o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:500) (*Rabbit anti-goat IgG*, HRP *conjugate* - Invitrogen™) foi adicionado e incubado por mais duas horas em temperatura ambiente. Por fim, bandas imunorreativas foram visualizadas usando o *kit* Amersham ECL *Western blotting detection* (GE Healthcare™).

3.10.5 ELISA Indireto para proteínas recombinantes e extrato do *M. agalactiae*

As oito amostras purificadas individualmente da propriedade A foram avaliadas para todas as proteínas recombinantes por ELISA indireto. Foram utilizados 1 µg/ poço do extrato da célula de *M. agalactiae* e 200 ng/ poço das proteínas recombinantes como descrito acima.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad-Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Para avaliar a reatividade entre as proteínas recombinantes e o extrato total de *M. agalactiae* com os soros de caprinos no ELISA, previamente os dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição normal ou não dos dados. Foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando avaliados dois grupos. Dados expressos pela Média $\pm$ Desvio Padrão. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ utilizando um intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* de *Mycoplasma agalactiae*

M. agalactiae PG2 possui um total de 666 CDSs, sendo que 156 CDSs apresentaram localização de transmembrana ou extracelular, de acordo com o PSORTb, as quais foram selecionados para análises posteriores. As 156 CDSs selecionadas foram avaliadas pelo *web-software* IEDB *Analysis Resource* para predições de: *beta-turn*, acessibilidade e epítomos lineares e conformacionais de células B. Após a filtragem com os fatores de exclusão (descritos na metodologia), vinte proteínas foram caracterizadas como possivelmente antigênicas, dessas foram selecionadas quatro, as quais tiveram melhores predições, para prosseguir com a clonagem utilizando *E. coli*. A figura 6 representa um esquema com os resultados obtidos inicialmente e a tabela 4 e figura 7 apresentam a caracterização das quatro proteínas selecionadas.

Figura 6 - Fluxograma das análises *in silico* para seleção das proteínas alvo

Tabela 4 - Comparação entre *software* para predições de peptídeo sinal e predições da topologia das proteínas de membrana descritas nesse trabalho

Softwares	WP_011949419.1	WP_011949418.1	WP_011949336.1	WP_011949770.1
Psortb ^a	IM	IM	IM	IM
TMPRED ^b	22	25	29	20
HMTOP ^b	22	25	27	Out ^c
TOPCONS	Peptídeo sinal	Peptídeo sinal	Peptídeo sinal	Peptídeo sinal
TopPred	In-out ^d	In-out	In-out	In-out
DAS	Peptídeo sinal	Ausência de sequência transmembranica	Ausência de sequência transmembranica	Ausência de sequência transmembranica
TMHMM	Out	Out	Out	Out

Notas: ^a Localização proteica foi predita usando o *web-software* PSORTb: (IM) indiretamente ligada à membrana.

^b Aminoácidos inseridos na membrana.

^c A proteína está localizada fora da célula.

^d A proteína está direcionada a partir da membrana para o meio extracelular.

Figura 7 - Predições pelo *web-software* IEDB Analysis Resource e CBTOPE

> WP_011949419.1

MKKVKLILGALLPITTIPFIAASCNDIELVKS**E**ASKQDQNNNKIDKKVEK**TES**HNLKSSTNNGL
EDKKENETIEKDKPITILEKIE**TPEI**PKTKQDKSKEAKCKEETKKEEK**KNEEETDD**DFSLFNF
 NMSS**KADQNPENESE**SLNEDTLTSYKSKISSEISELNKE**V**KNYNGFINDEIKSQ**F**EELKEKL
 NKLLT**S**ASTSDDI**E**KILTQLDFFSEQ**F**EGYNIKIES**MKNN**KEN

>WP_011949418.1

MKTNRKILFGLLTASSFTI**AVP**LLAAKCDKNENSQKNPQ**DNGDKVEK**QALGEVVKNTNLG
 EIVLPKD**KEIPE**ASSILESLVKTNA**TV**DTSELEVSNI**LKNGA**TVSAKKE**SKKYS**GSINVTFTIK
KSDDVAKKDLSKVN**KDN**FKFLTNFVFGSD**L**LEAL**K**TDLELPN**LKL**DDFQFTVDKLAT**ADK**
EGKL**VIEAKPT**SKLITGT**VILDIPRL****VVKP**TEENHNIADAKLLDETLKNLSILE**SK**MDSNI**KNIE**
KWEANTS**DGGV**FTEEAK**KIKD**TSSQ**VKAKFKEAK**TKVEM**LIKDKTKLS**DEEIK**SANKI**INDF
 IAYYFTE**VKSKDT****GKII**YDGENT**MR**DIKKIAKL**KNGNQEK**DSLIEF

> WP_011949336.1

MNK**V**NKKFLTAMGGGIITSLALPIVAAS**CD**NKAKNEQPKN**N**DDLPNDDSNNNNVDNNKDS
 TSASIS**M**NESGAKSETVENSNSHTTRNV**SNKDM**KDT**KISKE****S**EASIYLYEK**W**GCDIYKFDP
NSPNFKKPDKNSQTD**A**PSRITNESNTVS**FSSFNPEF**KKYL**TET**YTFW**NELKAF**VI**AVS****KSK**
DQELL**RKYQKH**FELWKII**DQIIQSVTL**NPNGKDSLQE**QF****KDSE**TRD**H**L**HLN****LK**SYEDIRSEV
 NDFVKKLNKK

> WP_011949770.1

MKSKFLMTLPVLFTFPIVS**ASCTD**INQNNST**AENK**KPDS**NE**KIKVD**NATTNNANS**EN**KND**
GR**SKTE**QPS**KDQAET**YST**SNVN**KQKEEMLKKLKEELPKLKEKKVELEKTIEETKPTEEQL
KKAWQDIEN**KANTSPSEYDESK**LKE**AYEK**W**LTVYDKL**TNAKNELEILTKSKMIEQTEQAIE**K**
LETKLKAK

Legenda: Predições de *beta-turn* (aminoácidos sublinhados), acessibilidade (negrito) e epítomos lineares (marcados em cinza) e conformacionais (aminoácidos em vermelho) para células B. Asteriscos (*) indicam triptofanos codificados pelo códon TGA.

Além disso, as quatro sequências foram avaliadas pelo algoritmo SAPS. Como demonstrado na tabela 05, todas as proteínas analisadas possuem significativamente mais lisina, enquanto que a arginina foi o aminoácido menos presente. As análises por SAPS também identificaram duas sequências, as quais repetem duas vezes cada na proteína WP_011949418.1 (P40). Estas incluem os

aminoácidos serina, isoleucina, leucina, ácido glutâmico, apresentados da seguinte forma: SILES; e os resíduos leucina, lisina, arginina e glicina apresentados como LKNG. Observou-se também unidade de repetição na proteína WP_011949770.1, incluindo os aminoácidos lisina, leucina e ácido glutâmico apresentado como KLKE repetido três vezes ao longo de toda a sequência. Entretanto, apesar de unidades de repetição estarem presentes em duas das quatro proteínas analisadas, as sequências repetidas não estão localizadas nos epítomos lineares ou conformacionais preditos pelos *softwares* IEDB e CBTOPE. Unidades de repetições de aminoácidos não foram observados nas proteínas WP_011949419.1, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Características únicas das proteínas como unidades de repetição e frequência de aminoácidos obtidas através do *software* SAPS

Número de acesso no GenBank	Unidades de Repetição	Aminoácidos mais frequentes	Aminoácidos menos frequentes
WP_011949419.1	-	Ac. Glutâmico, asparagina e lisina	Alanina, arginina, glicina, histidina e valina
WP_011949418.1	SILES 75- 79; 237-241 LKNG 98- 101; 346- 349	Lisina e ac. aspártico	Histidina e arginina
WP_011949336.1	-	Lisina, serina e asparagina	Arginina
WP_011949770.1	KLKE 92- 95; 99- 102; 143- 146	Ac. Glutâmico e lisina	-

Notas: S: Serina; I: Isoleucina; L: Leucina; E: Ácido glutâmico; K: Lisina; N: Asparagina; G: Glicina.

As análises para caracterização das famílias gênicas de parálogos em *M. agalactiae* PG2 identificou 39 famílias indicando prováveis eventos de duplicação gênica. Dentre as proteínas selecionadas nesse estudo apenas a proteína WP_011949418.1 (P40) está agrupada em uma família de genes parálogos, a qual é composta pela proteína WP_011949418.1 (P40) e WP_011949417.1. Avaliações de homologia usando BLAST e DELTA BLAST evidenciaram que a proteína P40 (WP_011949418.1) demonstrou homologia com as proteínas hipotéticas de *M. bovis* (WP_013954686.1, cobertura 100% e identidade de 36%; e WP_041309154.1, cobertura de 96% e identidade de 36%) além da proteína hipotética WP_011949417.1 do próprio *M. agalactiae* (cobertura de 100% e identidade de

36%), como esperado, uma vez que estão agrupadas na mesma família de parálogos. O alinhamento dessas sequências é evidenciado no Apêndice A. De forma semelhante, a proteína WP_011949336.1 demonstrou homologia com uma proteínas hipotética (cobertura de 98% e identidade de 33%) e com a lipoproteína P48 de *M. bovis* (cobertura de 99% e identidade de 30%) (Apêndice B). Da mesma maneira, a proteína WP_011949770.1 também apresentou homologia com uma proteína hipotética de *M. bovis* (WP_013456028.1) (cobertura 99% e identidade 37%) (Apêndice C). Em contraste, a proteína WP_011949419.1 não demonstrou homologia significativa com proteínas de outros micro-organismos, sendo portanto, provavelmente uma molécula específica de *M. agalactiae*.

4.2 Amplificação e clonagem

Das quatro CDSs, apenas uma não foi amplificada pela técnica de PCR (WP_011949336.1). Após clonagem e análise dos transformantes por sequenciamento, foi possível confirmar a presença e orientação correta do inserto para CDS da proteína WP_011949419.1. Devido ao baixo rendimento da clonagem, dificuldades em padronizar reações de amplificações de sequências possivelmente antigênicas e presença do códon TGA, vetores de expressão contendo o gene codificante das proteínas WP_011949418.1, WP_011949336.1 e WP_011949770.1 foram sintetizados pela *GenScript* (Piscataway, EUA).

4.3 Expressão das proteínas

Após transformação em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) *One Shot* e antes de serem expressas em larga escala, as proteínas recombinantes foram induzidas em pequeno volume para avaliar sua expressão e solubilidade. Os vetores utilizados nesse estudo, pET-28a(+) e pET200D/TOPO His-tag, permitiram que as proteínas fossem expressas fusionadas à seis aminoácidos de histidina a qual permitiu a identificação das proteínas recombinantes por *Western blotting*. Todas as proteínas expressas foram majoritariamente solúveis (tabela 6 e figura 8).

Tabela 6 - Identificação das CDSs selecionadas de *M. agalactiae* estirpe PG2

Número de acesso no GenBank	Sequência clonada	Proteína expressa	Peso molecular^a	Proteína Purificada
WP_011949419.1	Sim	Sim	30KDa	Sim
WP_011949418.1	Síntese ^b	Sim	42KDa	Sim
WP_011949336.1	Síntese	Sim	32KDa	Sim
WP_011949770.1	Síntese	Sim	24KDa	Sim

Legenda: ^a Predição do peso molecular aproximado considerando a inserção no vetor e a sequência de poli-histidina obtidas após submissão no ProtParam.

^b Sintetizados pela GenScript (Piscataway, EUA).

Figura 8 - Perfil de expressão e purificação das proteínas de membrana recombinantes de *M. agalactiae* em gel de poliácridamida e reconhecimento das proteínas por anticorpo pelo *Western blotting*

Legenda: Perfil proteico de *M. agalactiae* expresso por *E. coli* BL21 (DE3) evidenciado por eletroforese em gel de poliácridamida 12% corado com *comassie Blue* e (WB) *Western blotting* das quatro proteínas expressas. **A** - WP_011949419.1 (30 KDa); **B** - WP_011949418.1 (P40) (42 KDa); **C** - WP_011949336.1 (32 KDa); **D** - WP_011949770.1 (24 KDa). WB (*Western blotting*) reconhecimento de proteínas por anticorpo anti-histidina (6x-His *Epitope Tag*, Invitrogen™). Coluna 1: Peso molecular

Novex® Sharp *Protein Standard*; Coluna 2: Extrato celular total de *E. coli* BL21 (DE3) não induzidas com IPTG; Coluna 3: Expressão das proteínas recombinantes após indução *overnight* com IPTG; Coluna 4: Fração solúvel do extrato bacteriano total após indução. Coluna 5: Fração insolúvel do extrato bacteriano após indução. Evidenciam-se as quatro proteínas expressas predominantemente na fase solúvel, indicadas pelas setas.

4.4 Purificação proteica

Todas as quatro proteínas recombinantes foram expressas e purificadas em concentrações variadas (100 – 200 µg/L de cultura). Dentre as proteínas expressas, a proteína WP_011949419.1 foi o peptídeo que possuiu menor pureza na purificação, como demonstrado na figura 9.

Figura 9 - Proteínas recombinantes purificadas.

Legenda: Perfil de pureza das quatro proteínas em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie Blue*. Coluna 1: Peso molecular Novex® Sharp *Protein Standard*; Coluna 2: WP_011949419.1 (30 KDa); Coluna 3: WP_011949418.1 (P40) (42 KDa); Coluna 4: WP_011949336.1 (32 KDa); Coluna 5: WP_011949770.1 (24 KDa).

4.5 Análise da antigenicidade das proteínas recombinantes

4.5.1. Seleção de amostras reativas à P40

Resultados do ELISA para a proteína P40 recombinante e os soros de animais ($n = 36$) não purificados contra antígenos de *E. coli* são apresentados na figura 10. O *background* dessa reação apresentou D.O. média de 0,051. Com base nesses resultados foram selecionados as amostras com as cinco maiores D.O. ($> 0,700$) para a formação do *pool* (descritos no apêndice A) a ser utilizado nas análises posteriores.

Figura 10 - Avaliação da reatividade dos soros de animais reativos à P40 recombinante

Legenda: Densidade óptica (492 nm) da imunorreatividade entre o soro de caprinos não purificados com antígenos de *E. coli* ($n = 36$) e a proteína recombinante P40 (200 ng/ poço) de *M. agalactiae*.

4.5.2 Western blotting

Resultados do *Western blotting* utilizando o *pool* de soro purificado estão apresentados na figura 10. Todas as proteínas foram reconhecidas por anticorpos

deste *pool* (figura 10). Este soro também foi capaz de reconhecer em *Western blotting* o extrato proteico de *M. agalactiae* após sonicação (não mostrado).

Figura 10 - Reconhecimento das proteínas recombinantes com o *pool* de soro de caprinos

Legenda: *Western blotting* demonstrando o reconhecimento das proteínas recombinantes com o *pool* de soros de caprinos naturalmente infectados. Coluna 1: WP_011949419.1 (30 KDa); Coluna 2: WP_011949418.1 (P40) (42 KDa); Coluna 3: WP_011949336.1 (32 KDa); Coluna 4: WP_011949770.1 (24 KDa).

4.5.2 ELISA Indireto

A figura 11 apresenta as D.O. obtidas nos ELISAs de todas as proteínas recombinantes avaliadas e do extrato de *M. agalactiae* com as oito amostras de soros de caprinos purificados com os antígenos de *E. coli*. É possível observar uma menor D.O. da proteína WP_011949419.1 quando comparada ao extrato de *M. agalactiae* e ao controle de *background* para a reação ($p < 0,05$). Observa-se também uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar as outras proteínas recombinantes e o extrato de *M. agalactiae* ao controle de *background* para a reação ($p < 0,05$), resultado semelhante ao observado com o *pool* de soro utilizado no *Western blotting*.

Figura 11 - Avaliação da reatividade dos soros de animais reativos a proteína recombinante P40 e extrato total de *M. agalactiae*

Legenda: Densidade óptica (492 nm) da imunorreatividade entre os soros de caprinos purificados com antígenos de *E. coli* (n= 8) e as proteínas recombinantes (200 ng/ poço) de *M. agalactiae* e ao extrato total sonificado de *M. agalactiae* (1 µg/ poço). Controle de *background* (reação sem o antígeno ou sem o anticorpo primário). *p< 0,05 em comparação ao controle de *background*; # p < 0,05 comparação entre a reatividade do *M. agalactiae* e a proteína recombinante WP_011949419.1 com os soros dos animais.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a identificação de proteínas antigênicas de *M. agalactiae* a partir da análise *in silico* e *in vitro* de proteínas localizadas na superfície deste micro-organismo. Para que fosse possível selecionar candidatos de proteínas possivelmente antigênicas, foi realizado uma análise *in silico* do proteoma do *M. agalactiae*. Observou-se que, dentre as CDSs preditas do genoma de *M. agalactiae*, 23% são proteínas transmembranas ou proteínas secretadas ou proteínas ligadas covalentemente à membrana de acordo com o PSORTb. Resultado semelhante foi encontrado ao avaliar o proteoma da fase lipossolúvel de *M. agalactiae*, o qual identificou o total de 194 proteínas localizadas na membrana ou associadas a ela, correspondendo a 26% de todos os genes de *M. agalactiae* PG2 (CACCIOTTO, 2010). Convém ressaltar que bactérias da classe *Mollicutes* não possuem parede celular, e dessa forma, algoritmos de análises de proteínas de membrana de bactérias típicas como o SignalP versão 4.1 (PETERSEN et al., 2011) e o TMHMM versão 2.0 (KROGH et al., 2001) não são recomendados (NASCIMENTO et al., 2014). Desta maneira, os resultados do *software* PSORTb versão 3.0.2 (NAKAI, HORTON, 1999; YU et al., 2010) são os mais consistentes. PSORTb é a única ferramenta que proporciona a escolha do *output* para bactéria gram-negativa sem a membrana externa, tornando-se mais confiável nas predições para as espécies de micoplasmas (NASCIMENTO et al., 2014). Além disso, o PSORTb é o *software* mais utilizado para prever a localização de uma proteína em procariotos (GARDY; BRINKMAN, 2006; MOVAHEDI; HAMPSON, 2008; MUDADU; CARVALHO; LECLERCQ, 2015; TALUKDAR et al., 2014). Proteínas de superfície ou secretadas ou lipoproteínas são candidatas para o desenvolvimento de vacinas ou como alvos em estudos que objetivam o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, pois seus antígenos microbianos são mais facilmente acessíveis para os anticorpos e componentes do sistema imune. Especificamente para *M. agalactiae*, proteínas de superfície recombinantes podem ser uma alternativa à vacinas de primeira geração para prevenção da AC, uma vez que estas promovem apenas a resposta imune humoral de curta duração (CHESSA et al., 2009)

Dessa forma, as 156 CDSs transmembranas, secretadas ou indiretamente ligadas à membrana selecionadas foram então avaliadas pelo *web-software* IEDB

Analysis Resource e CBTOPE para predição de epítomos lineares e conformacionais de células B, respectivamente. Epítomos, regiões de um antígeno que se ligam a receptores de membrana em linfócitos específicos ao antígeno ou anticorpos secretados, podem ser classificados em contínuos e descontínuos (CHAUDHURI et al., 2014). O epítopo linear/ contínuo é caracterizado pelo segmento de resíduos consecutivos na sequência primária, enquanto um epítopo descontínuo/ conformacional é um grupo de resíduos que estão distantes na sequência primária, mas como resultado do enovelamento do polipeptídeo, possuem proximidade espacial. A maior parte dos epítomos (~ 90 %) são conformacionais (ANSARI; RAGHAVA, 2010). Neste estudo, os *software* mencionados permitiram avaliar, a partir de propriedades físico-químicas, estruturas com aminoácidos internos e externos à proteína com a presença de domínios ricos em aminoácidos hidrofóbicos e a presença de epítomos lineares e conformacionais em todas as proteínas selecionadas. A utilização desses algoritmos permitiu que 20 possíveis CDSs fossem selecionadas, dentre os 156, para serem expressos, sendo que 4 foram finalmente escolhidos para análises antigênicas *in vitro*. No entanto, a identificação de epítomos usando bioinformática possui limitações e outros estudos são necessários para comprovar os métodos de predição (ASSIS et al., 2014). A identificação de epítomos de células B é importante para aplicações de imunodeteção e imunoterapia, pois um epítopo constitui a unidade mínima imune suficiente para promover a resposta imune humoral (ANSARI; RAGHAVA, 2010; SUN et al., 2013). Micoplasmas geralmente provocam uma infecção crônica e indução de anticorpos, provavelmente devido a presença de lipoproteínas, as quais são fortemente imunogênicas nos seus hospedeiros naturais. Essas moléculas são responsáveis por induzir uma resposta imune humoral precoce e duradoura, características que as tornam importantes alvos de estudos (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2008; FLEURY et al., 2002; ROSATI et al., 2000; TOLA et al., 2001).

As proteínas P40 (WP_011949418.1), WP_011949419.1, WP_011949336.1 e WP_011949770.1 foram selecionadas para este estudo. Devido a diferenças nos algoritmos disponíveis, sete diferentes *software* de predição foram utilizados para identificar domínios transmembranares e presença de peptídeo sinal neste estudo. Ao analisar as sequências dessas quatro proteínas, foi possível observar a presença

de domínios N-terminal verdadeiros inseridos na membrana, o qual corresponde a sequência de peptídeo sinal. Essas proteínas foram preditas como proteínas indiretamente ligadas à membrana pelo PSORTb. Porém, convém ressaltar que enquanto alguns dos sete *software* utilizados sugerem domínios transmembranares, a maioria dos programas predizem a sequência de peptídeo sinal. Desta forma, esses domínios transmembranares identificados por esses programas nas quatro proteínas analisadas provavelmente correspondem às sequências de peptídeo sinal localizada nos primeiros 20 - 30 aminoácidos. Acredita-se que toda a outra porção das proteínas esteja em contato com o meio extracelular.

As proteínas WP_011949419.1 e WP_011949770.1 estão anotadas no *GenBank* como proteínas hipotéticas mas as análises realizadas demonstram que estas são provavelmente lipoproteínas, assim como a WP_011949336.1, as quais estão indiretamente ligadas à membrana. A proteína WP_011949419.1 não demonstrou homologia com outra proteína bacteriana. Ao contrário, a proteína WP_011949336.1 demonstrou homologia com uma proteína hipotética de *M. bovis* além da lipoproteína P48. Entretanto, tem-se evidenciado que a lipoproteína P48 de *M. bovis* não revelou reatividade com soros de animais infectados em condições desnaturantes por *Western blotting*, mas revelou reatividade com a P48 recombinante em ELISA, sugerindo que, nesse caso, epítomos conformacionais possuem maior relevância (ROBINO et al., 2005). Estes resultados são contrários ao que foi obtido no presente estudo com a proteína WP_011949336.1 recombinante, a qual foi reconhecida mesmo em condições desnaturantes. A proteína WP_011949770.1 também demonstrou homologia com uma proteína hipotética de *M. bovis* (WP_013456028.1). *M. bovis* e *M. agalactiae* possuem características fenotípicas e genotípicas estreitamente relacionadas, compartilhando diversos antígenos e epítomos. Desta maneira, a reatividade cruzada entre os dois micoplasmas é esperado, embora sejam geralmente hospedeiro-específico (ROBINO et al., 2005). Em geral, por serem moléculas acessíveis e presentes principalmente em *M. agalactiae* constituem-se em possíveis alvos para imunodeteção e prevenção deste micro-organismo.

Após determinação do perfil proteico para avaliar a expressão e solubilidade das proteínas clonadas neste estudo, observou-se que estas, foram detectadas principalmente na fração solúvel. Na eletroforese vertical e *Western blotting* (anti-

histidina) foi possível confirmar a indução da expressão das proteínas recombinantes. Ao contrário dos resultados deste estudo, a proteína P40 recombinante expressa foi recuperada a partir de corpos de inclusão com a adição do agente caotrópico cloridrato de guanidina 6 M à fração insolúvel por Fleury et al., (2002). Baixas temperaturas de expressão, como a utilizada nesse estudo (18 °C), permitem que proteínas sejam expressas em menores quantidades ao longo do tempo, auxiliando na formação das estruturas secundárias e terciárias adequadas (PEREIRA, 2009). Dessa forma, as proteínas foram expressas em enovelamento possivelmente correto.

Este é o primeiro relato das proteínas WP_011949419.1; WP_011949336.1 e WP_011949770.1 de *M. agalactiae* descritas como possivelmente antigênicas. Todas as proteínas recombinantes foram avaliadas quanto à antigenicidade por *Western blotting* e ELISA. Como demonstrado, todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo *pool* de soros purificados de caprinos naturalmente infectados. Dentre as quatro proteínas, o peptídeo WP_011949336.1 foi visualmente mais reativo, corroborando com o ELISA. Estes resultados indicam que as quatro proteínas são expressas ao longo da infecção em caprinos e capazes de induzir a produção de anticorpos durante a infecção natural. Além disso, os resultados da metodologia do *Western blotting* permitem inferir que a reconhecimento dos peptídeos estudados não são dependentes da estrutura conformacional. Ainda assim, comparar os resultados obtidos com soro de animais com ausência de anticorpos contra *M. agalactiae* é relevante, entretanto, animais assintomáticos, a transmissão sexual (ALVES et al., 2013; AMORES et al., 2011) e a transmissão vertical desse micro-organismo através de colostro e leite contaminados (PATERNA et al., 2013) consistem de empecilhos para a obtenção de soros de animais que nunca tiveram contato com esse micoplasma.

Dentre as proteínas avaliadas nesse estudo, a proteína P40 (WP_011949418.1) foi a única identificada como parte de uma família de genes parálogos (composta por WP_011949418.1 e WP_011949417.1). O fato das outras três proteínas serem cópias únicas no genoma do *M. agalactiae* diminui a possibilidade de variação antigênica, fazendo com que essas proteínas sirvam de fortes candidatos ao desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas. Porém, mesmo que a P40 esteja possivelmente envolvida em um evento de duplicação

gênica, essa proteína também parece não estar envolvida em eventos de variação de fase de alta frequência, uma vez que análises da sequência de DNA não identificaram que o gene *p40* esteja relacionado à esse mecanismo (NOUVEL et al., 2009). Sistemas de variação de fase proporcionam à micoplasmas uma superfície celular versátil, com o intuito de compensar a falta de sistemas de regulação, permitindo a modulação da interação entre patógeno e hospedeiro (GLEW et al., 2000). A P40 foi descrita por estar envolvida com a adesão de *M. agalactiae* à células da membrana sinovial de ovelhas. Ainda, P40 possui possivelmente um motivo rico em leucina, semelhantemente à adesina P50 em *M. hominis*, além da composição de aminoácidos similares sugeriu-se que estas teriam função análoga (FLEURY et al., 2002). No mesmo estudo, Fleury et al., (2002) comprovaram, que a P40 de *M. agalactiae* está localizada na superfície desse patógeno e expressa na maioria dos sorotipos desse micro-organismo (exceto sorotipo C). Os mecanismos da ausência de expressão dessa proteína em algumas estirpes ainda não estão definidos, entretanto, sabe-se que todos os sorotipos possuem o gene *p40*. Além disso, após infecção experimental em ovelhas por *M. agalactiae* PG2 foi indicado que P40 é fortemente imunogênica induzindo anticorpos que persistem pelo menos por três meses após a infecção.

Tem-se demonstrado que proteínas de membranas de micoplasmas e proteínas associadas, possuem função relevante na aderência, no transporte de nutrientes, na interação enzimática com o hospedeiro e na indução ou evasão da resposta imune (BROWNING et al., 2011). Em *M. agalactiae*, poucos antígenos de membrana tinham sido identificados como imunogênicos até então. Em análises por *immunoblotting* ao utilizar soro de caprinos e ovelhas naturalmente infectados tem-se destacado algumas proteínas imunodominantes com peso molecular entre 25 e 90 KDa (SANTONA et al., 2002; SOLSONA; LAMBERT; POUMARAT, 1996; TOLA et al., 1996, 1997). Dentre as moléculas descritas na literatura inclui-se a lipoproteína P30, a qual possui baixa similaridade com proteínas de membrana de *M. bovis*. Essa proteína possui imunogenicidade e induz resposta humoral persistente pelo menos por dois meses pós-infecção. Apesar de todos os sorotipos de *M. agalactiae* possuírem o gene *p30*, esse peptídeo não é expresso nos sorotipo E ao H, os quais são mais raramente isolados. P48 consiste de outra proteína de membrana de *M. agalactiae* capaz de ser reconhecida por anticorpos de animais infectados no início

da infecção e com motivos e aminoácidos com similaridade às lipoproteínas de *M. fermentans* (CHESSA et al., 2009; LYSNYANSKY; YOGEV; LEVISOHN, 2008; ROSATI et al., 1999). A lipoproteína MAG_5040, homóloga à nuclease estafilocócica dependente de magnésio, tem sido caracterizada como uma proteína antigênica com atividade de nuclease potencialmente envolvida na patogenicidade de *M. agalactiae*, capaz de induzir anticorpos em cabras e ovelhas por até nove meses após a infecção (CACCIOTTO et al., 2013). Entretanto, apesar da descrição de imunogenicidade dessas proteínas, métodos terapêuticos e de prevenção para o controle da AC contra infecções por *M. agalactiae* são ainda necessários. Além disso, a diversidade fenotípica das moléculas de superfície deste organismo (BERGONIER et al., 1996) dificulta a busca de epítomos comuns em todas as estirpes. Mais estudos devem ser realizados para que se confirme a expressão das proteínas WP_011949419.1; WP_011949336.1 e WP_011949770.1 nos diferentes sorotipos de *M. agalactiae*, assim como nas diferentes fases da infecção.

Os fatores envolvendo a virulência e interação do *M. agalactiae* com o hospedeiro são pouco conhecidos. Apesar de proteínas envolvidas na adesão e lipoproteínas moduladoras da resposta imune tenham sido descritas, (CACCIOTTO et al., 2013; FLEURY et al., 2002; ROTTEM, 2003), poucas proteínas de membrana foram identificadas como antigênicas (CACCIOTTO et al., 2013, FLEURY et al., 2002, ROSATI et al., 2000, TOLA et al., 2001). Com a disponibilidade da sequência genômica desse micro-organismo (SIRAND-PUGNET et al., 2007; TARDY et al., 2012) e ferramentas de bioinformática para identificação de proteínas de membrana e antígenos, a procura global por imunógenos de *M. agalactiae* tornou-se possível. A exemplo de outros micoplasmas (ABDO; NICOLET; FREY, 2000; GUIMARÃES et al., 2014; HOELZLE et al., 2007; LI et al., 2010; MESSICK; SANTOS, 2011; VARSHNEY et al., 2008), espera-se que o método de bioinformática empregado neste estudo possa identificar alvos relevantes para controle do *M. agalactiae*.

Dessa forma, neste estudo foram obtidas quatro proteínas transmembranas de *M. agalactiae*, três delas ainda não avaliadas em outros estudos, com características antigênicas e com epítomos acessíveis, mesmo em condições desnaturantes, as quais foram imunorreativas ao soro de animais naturalmente infectados. Esta condição tornam as proteínas obtidas potenciais alvos para imunoterapia e desenvolvimento de imunodiagnósticos. Uma vacina recombinante

de *M. agalactiae* para prevenção da AC teria diversas vantagens, como a produção de antígenos em grande quantidade, estabilidade no armazenamento e transporte e com menos efeitos secundários indesejáveis. Contudo, a extensão destes estudos, devem avaliar melhor a função dessas proteínas na patogênese de *M. agalactiae* e se essas moléculas promovem uma resposta imune humoral longa e protetora para o desenvolvimento de vacinas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram identificadas e selecionadas quatro proteínas de membrana de *M. agalactiae* possivelmente antigênicas através de análises de bioinformática;
- As quatro sequências proteicas selecionadas foram expressas em *E. coli* como hospedeiro heterólogo e purificadas;
- Todas as proteínas recombinantes purificadas foram reconhecidas aos soros de caprinos naturalmente infectados pelo *M. agalactiae*.
- Os resultados auxiliam a identificação de alvos para vacinas de subunidades e testes imunológicos para Agalaxia contagiosa em animais infectados pelo *M. agalactiae*.

REFERÊNCIAS*

- ABDO, E. M.; NICOLET, J.; FREY, J. Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 4, p. 588–595, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- ADDIS, M. F.; PISANU, S.; GHISAURA, S.; PAGNOZZI, D.; MAROGNA, G.; TANCA, A.; BIOSA, G.; CACCIOTTO, C.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; ROGGIO, T.; UZZAU, S. Proteomics and pathway analyses of the milk fat globule in sheep naturally infected by *Mycoplasma agalactiae* provide indications of the in vivo response of the mammary epithelium to bacterial infection. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3833–3845, set. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3165467&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.
- ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, p. 605-610, 2003.
- ALBERTI, A.; ROBINO, P.; CHESSA, B.; ROSATI, S.; ADDIS, M. F.; MERCIER, P.; MANNELLI, A.; CUBEDDU, T.; PROFITI, M.; BANDINO, E.; THIERY, R.; PITTAU, M. Characterisation of *Mycoplasma capricolum* P60 surface lipoprotein and its evaluation in a recombinant ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 81–89, abr. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507004804>>.
- ALCÂNTARA, M. D. B.; CAMPOS, A. C.; MELO, M. A.; PEREIRA FILHO, J. M.; NASCIMENTO, E. R.; FARIAS, A. A.; SOUSA, D. R. M.; AZEVEDO, E. O. Resposta imunológica em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 561–564, maio 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 13 nov. 2015.
- AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R. a J.; ABO-SHEHADA, M. N. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. **Preventive veterinary medicine**, v. 83, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881071>>. Acesso em: 2 out. 2014.
- ALVA, V.; NAM, S.-Z.; SÖDING, J.; LUPAS, A. N. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. April 2016, p. gkw348, 2016. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkw348>>.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALVES, B. H. L. S.; SILVA, J. G.; MOTA, A. R.; CAMPOS, A. C.; JÚNIOR, J. W. P.; SANTOS, B.; MOTA, R. A. Mycoplasma agalactiae in semen and milk of goat from. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 11, p. 1309–1312, 2013.

AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1265–1270, 15 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220162>>. Acesso em: 2 out. 2014.

ANDERSEN, H. P.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Sci.** 15:2558-2567, 2006.

ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. **Immunome Research**, v. 6, n. 1, p. 6, 2010. Disponível em: <<http://www.immunome-research.com/content/6/1/6>>.

ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. A survey of Mycoplasma agalactiae in dairy sheep farms in Spain. **BMC veterinary research**, v. 8, n. September, p. 171, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Molecular characterization of Mycoplasma agalactiae reveals the presence of an endemic clone in Spain. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 656–560, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3553876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

ASSIS, L. M.; SOUSA, J. R.; PINTO, N. F. S.; SILVA, A. A.; VAZ, A. F. M.; ANDRADE, P. P.; CARVALHO, E. M.; DE MELO, M. A. B-cell epitopes of antigenic proteins in Leishmania infantum: An in silico analysis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 7, p. 313–323, 2014.

ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, N. T.; ROSALES, R. S.; DE LA FE, C.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B.; DAVEY, H. M. Flow cytometric method for the assessment of the minimal inhibitory concentrations of antibacterial agents to Mycoplasma agalactiae. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 69, n. 10, p. 1071–1076, 1 out. 2006a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998868>>.

ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, N. T.; ROSALES, R. S.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B.; DAVEY, H. M. Flow cytometric determination of the effects of antibacterial agents on Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma putrefaciens, Mycoplasma capricolum subsp. capricolum, and Mycoplasma mycoides subsp. mycoides large colony type. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2845–2849, ago. 2006b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538642&tool=pmcentrez>>

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 set. 2014.

ASSUNÇÃO, P.; DAVEY, H. M.; ROSALES, R. S.; ANTUNES, N. T.; DE LA FE, C.; RAMIREZ, A. S.; DE GALARRETA, C. M. R.; POVEDA, J. B. Detection of mycoplasmas in goat milk by flow cytometry. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 71, n. 12, p. 1034–1038, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972304>>. Acesso em: 2 out. 2014.

ATAEE, R. A.; GOLMOHAMMADI, R.; ALISHIRI, G. H.; MIRNEJAD, R.; NAJAFI, A.; ESMAEILI, D.; JONAIIDI-JAFARI, N. Simultaneous detection of mycoplasma pneumoniae, mycoplasma hominis and mycoplasma arthritidis in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by multiplex PCR. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 6, p. 345–350, 2015.

AVRAMIDIS, N.; VICTORATOS, P.; YIANGOU, M.; HADJIPETROU-KOURELAKIS, L. Adjuvant regulation of cytokine profile and antibody isotype of immune responses to Mycoplasma agalactiae in mice. **Veterinary microbiology**, v. 88, n. 4, p. 325–338, 24 set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220808>>.

AYLING, R. D.; BASHIRUDDIN, S. E.; NICHOLAS, R. a J. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **The Veterinary record**, v. 155, n. 14, p. 413–416, 2004.

BAI, F.; NI, B.; LIU, M.; FENG, Z.; XIONG, Q.; SHAO, G. Mycoplasma hyopneumoniae-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 1, p. 58–67, 2015.

BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; NASCIMENTO, E. R.; MELO, L. S. S.; MELO, C. B. Infection by Mycoplasma agalactiae in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1255–1258, 2008.

BARANOWSKI, E.; GUIRAL, S.; SAGNÉ, E.; SKAPSKI, A.; CITTI, C. Critical role of dispensable genes in Mycoplasma agalactiae interaction with mammalian cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1542–1551, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by Their Notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 21–32, 1997.

BEAMAN, K. D.; POLLACK, J. D. Synthesis of adenylate nucleotides by Mollicutes (mycoplasmas). **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 10, p. 3103–3110, 1983.

BECKER, C. a M.; RAMOS, F.; SELLAL, E.; MOINE, S.; POUMARAT, F.; TARDY, F.

Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. **Journal of microbiological methods**, v. 90, n. 2, p. 73–79, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579581>>. Acesso em: 2 out. 2014.

BELLOU, L.; VILEI, E. M.; GIACOMETTI, M.; FREY, J. Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 185–193, 2003.

BENCINA, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 31, n. 6, p. 535–547, 2002. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0307945021000024526?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub=pubmed>.

BERGEY, D. H. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: _____. 2. ed. **Manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2010, v. 4, 721 p.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: Current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Revue scientifique et technique (International office of epizootics)**, v. 16, n. 3, p. 848–873, 1997.

BERGONIER, D.; DE SIMONE, F.; RUSSO, P.; SOLSONA, M.; LAMBERT, M.; POUMARAT, F. Variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 143, n. 2-3, p. 159–165, 1996.

BOESEN, T.; FEDOSOVA, N. U.; KJELDGAARD, M.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 10, n. 12, p. 2577–2586, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2374042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-van DILLEN, P. M.; van der NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**. Mar:28(3):495-503, 1990.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Caprinos e ovinos. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>>.

BRENDEL, V.; BUCHER, P.; NOURBAKHSH, I. R.; BLAISDELL, B. E.; KARLIN, S. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 6, p. 2002–2006, 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BROWNING, G. F.; MAREND, M. S.; NOORMOHAMMADI, a H.; MARKHAM, P. F. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. **Veterinary microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 44–50, 21 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684094>>. Acesso em: 19 nov. 2014.

BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; QUARANTA, V.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **The new microbiologica**, v. 31, n. 1, p. 117–23, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437850>>.

BÜRKI, S.; FREY, J.; PILO, P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary microbiology**, v. 179, n. 1-2, p. 15–22, 31 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113515000796>>. Acesso em: 9 abr. 2016.

BÜRKI, S.; GASCHEN, V.; STOFFEL, M. H.; STOJILJKOVIC, A.; FREY, J.; KUEHNI-BOGHENBOR, K.; PILO, P. Invasion and persistence of *Mycoplasma bovis* in embryonic calf turbinate cells. **Veterinary research**, v. 46, p. 1-14, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4432498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

CACCIOTTO, C.; ADDIS, M. F.; CORADDUZZA, E.; CARCANGIU, L.; NUVOLI, A. M.; TORE, G.; DORE, G. M.; PAGNOZZI, D.; UZZAU, S.; CHESSA, B.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. *Mycoplasma agalactiae* MAG_5040 is a Mg²⁺-dependent, sugar-nonspecific SNase recognised by the host humoral response during natural infection. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57775, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3585158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

CACCIOTTO, C.; ADDIS, M. F.; PAGNOZZI, D.; CHESSA, B.; CORADDUZZA, E.; CARCANGIU, L.; UZZAU, S.; ALBERTI, A.; PITTAU, M. The liposoluble proteome of *Mycoplasma agalactiae*: an insight into the minimal protein complement of a bacterial membrane. **BMC microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2010.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between *Mycoplasma* Lipoproteins and the Host Immune System. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 12, p. 493–499, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603485>>.

CHAUDHURI, R.; KULSHRESHTHA, D.; RAGHUNANDANAN, M. V.; RAMACHANDRAN, S. Integrative immunoinformatics for Mycobacterial diseases in R platform. **Systems and synthetic biology**, v. 8, p. 27–39, 2014.

CHAUSSÉE, M. S.; COLE, R. L.; VAN PUTTEN, J. P. M. Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by cultured mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3226–3232, 2000.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y. R.; ROS-BASCUÑANA, C.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, J. G.; FERNÁNDEZ-MOLINA, C.; JOHANSSON, K. E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary microbiology**, v. 47, p. 183-190, 1995.

CHAZEL, M.; TARDY, F.; LE GRAND, D.; CALAVAS, D.; POUMARAT, F. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. **BMC veterinary research**, v. 6, p. 1-8, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2892444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHELMONSKA-SOYTA, A.; MILLER, R. B.; RUHNKE, L.; ROSENDAL, S. Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. **Canadian journal of veterinary research**, v. 58, n. 4, p. 275–280, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7889459>>.

CHESSA, B.; PITTAU, M.; PURICELLI, M.; ZOBBA, R.; CORADDUZZA, E.; DALL, P.; ROSATI, S.; POLI, G.; ALBERTI, A. Genetic immunization with the immunodominant antigen P48 of *Mycoplasma agalactiae* stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 3, p. 414–420, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.09.010>>.

CHOPRA-DEWASTHALY, R.; BAUMGARTNER, M.; GAMPER, E.; INNEREBNER, C.; ZIMMERMANN, M.; SCHILCHER, F.; TICHY, A.; WINTER, P.; JECHLINGER, W.; ROSENGARTEN, R.; SPERGSE, J. Role of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* pathogenesis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 66, n. 3, p. 307–322, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22809092>>. Acesso em: 2 out. 2014.

CHOPRA-DEWASTHALY, R.; CITTI, C.; GLEW, M. D.; ZIMMERMANN, M.; ROSENGARTEN, R.; JECHLINGER, W. Phase-locked mutants of *Mycoplasma agalactiae*: defining the molecular switch of high-frequency Vpma antigenic variation. **Molecular microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1196–1210, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 47, p. 45-148, 1978.

CITTI, C.; NOUVEL, L.-X.; BARANOWSKI, E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. **Future microbiology**, v. 5, p. 1073–1085, 2010.

CITTI, C.; WATSON-MCKOWN, R.; DROESSE, M.; WISE, K. S. Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1356–1363, 2000.

CLAROS, M. G.; VON HEIJNE, G. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. **Cabios applications notes**, v. 10, n. 6, p. 685–686, 22 maio 1994.

COLE, B. C.; ATKIN, C. L. The Mycoplasma arthritis T-cell mitogen MAM: a model superantigen. **Immunology Today**, v. 12, n. 8, p. 271–276, 1991.

COLE, B. C.; KNUDTSON, K. L.; OLIPHANT, A.; SAWITZKE, A. D.; POLE, A.; MANOHAR, M.; BENSON, L. S.; AHMED, E.; ATKIN, C. L. The sequence of the Mycoplasma arthritis superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1105–1110, 1996.

CORDEIRO, P. R. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. **X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Média Mogiana**, p. 1–7, 2009.

CORRALES, J. C.; ESNAL, a.; DE LA FE, C.; SÁNCHEZ, a.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J. B.; CONTRERAS, a. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 154–166, mar. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448806002513>>. Acesso em: 2 out. 2014.

COTTEW, G. S.; LLOYD, L. C. An outbreak of pleurisy and pneumonia in goats in Australia attributed to a mycoplasma species. **Journal of comparative pathology**, v. 75, 1965.

CRUM-CIANFLONE, N.; SULLIVAN, E. Meningococcal Vaccinations. **Infectious diseases and therapy**, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086142>>.

CSEZSO, M.; EISENHABER, F.; EISENHABER, B.; SIMON, I. On filtering false positive transmembrane protein predictions. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 15, n. 9, p. 745–752, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456873>> \n <http://peds.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/protein/15.9.745>>.

DAMASSA, A. J.; WAKENELL, P. S.; BROOKS, D. L. Mycoplasmas of goats and sheep. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 113, p. 101–113, 1992.

DE AZEVEDO, E. O.; DE ALCÂNTARA, M. D. B.; DO NASCIMENTO, E. R.; TABOSA, I. M.; BARRETO, M. L.; DE ALMEIDA, J. F.; ARAÚJO, M. D. O.; RODRIGUES, A. R. O.; RIET-CORREA, F.; DE CASTRO, R. S. Contagious agalactia by Mycoplasma agalactiae in small ruminants in Brazil: First report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 576–581, 2006.

DE LA FE, C.; AMORES, J.; TARDY, F.; SAGNE, E.; NOUVEL, L.-X.; CITTI, C. Unexpected genetic diversity of Mycoplasma agalactiae caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. **BMC veterinary research**, v. 8, p. 146, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514313&tool=pmcentr>

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, T.; ROSALES, R. S.; POVEDA, J. B. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 170, n. 2, p. 257–259, set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964226>>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; RAMÍREZ, A.; POVEDA, J. B. Field trial of a combined vaccine against caprine contagious agalactia: humoral immune response in lactating goats. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 174, n. 3, p. 610–615, nov. 2007a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158077>>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; TOLA, S.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2340–2345, 8 mar. 2007b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239497>>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; MARTÍN, A. G.; AMORES, J.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; POVEDA, J. B.; CONTRERAS, A. Latent infection of male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* at an artificial insemination centre. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 1, p. 113–115, out. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.010>>.

DEBEY, M. C.; ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and immunity**, v. 62, n. 12, p. 5312–5318, dez. 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

DROZDETSKIY, A.; COLE, C.; PROCTER, J.; BARTON, G. J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 1, p. 389–394, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkv332>>.

DUŠANIĆ, D.; BERČIČ, R. L.; CIZELJ, I.; SALMIČ, S.; NARAT, M.; BENČINA, D. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 114–119, 2009.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Jornal of Virology**, v. 55, p. 836-839, 1985.

FAO. **FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - STATISTICS DIVISION**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>.

FERRIS, P.; NEYROLLES, O.; CHAMBAUD, I.; BLANCHARD, A. Phase Variations

of the *Mycoplasma penetrans* Main Surface Lipoprotein Increase Antigenic Diversity. v. 67, n. 4, p. 1569–1578, 1999.

FILHO, A. N.; JÚNIOR, C. A. F.; YAMAMOTO, A. Mercado De Carne , Leite E Pele De Caprinos E Ovinos No Nordeste. **Série Documentos do Etene**, n. 27, p. 1-15, 2010. Disponível em:
<http://www.bnb.gov.br/projwebren/Exec/livroPDF.aspx?cd_livro=159>.

FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A; JUNIOR, A. S. V.; FILHO, A. N.; YAMAMOTO, A. O mercado da carne de ovinos e caprinos no nordeste: avanços e entraves. In: **Congresso Brasileiro De Economia E Sociologia Rural**, v. 47, p. 1 - 5, 2009.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; PETERHANS, E.; FREY, J.; VILEI, E. M. Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5612–5621, out. 2002. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; SCHLATTER, Y.; FREY, J.; VILEI, E. M. Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2814–2822, ago. 2001. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAG, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats studies on live and dead vaccines in lactating sheep. **Journal of comparative pathology**, v. 81, 1971.

GARDY, J.; BRINKMAN, F. S. L. Methods for predicting bacterial protein subcellular localization. **Nature Reviews Microbiology**. V. 4, p. 741 - 751, 2006.

GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Immunisation of mice with mycoplasma hyopneumoniae antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 135–140, 2012.

GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; KLABUNDE, G. H. F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 9, p. 1370–1376, 2013.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., B. A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005. Disponível em:
<<http://web.expasy.org/protparam>>.

GLEW, M. D.; MAREDA, M.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. Surface diversity in *Mycoplasma agalactiae* is driven by site-specific DNA inversions within the vpma

multigene locus. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 21, p. 5987–5998, nov. 2002.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GLEW, M. D.; PAPAISI, L.; POUMARAT, F.; BERGONIER, D.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 8, p. 4539–4548, ago. 2000.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GÓMEZ-MARTÍN, A.; AMORES, J.; PATERNA, A.; DE LA FE, C. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: epidemiology and prospects for diagnosis and control. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 198, n. 1, p. 48–56, out. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759248>>. Acesso em: 2 out. 2014.

GONZÁLEZ-CANDELA, M.; CUBERO-PABLO, M. J.; MARTÍN-ATANCE, P.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Potential pathogens carried by Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) in southern Spain. **Journal of wildlife diseases**, v. 42, n. 2, p. 325–334, 2006.

GOJJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 2, p. 695–699, 2010.

GREGORY, L.; CARDOSO, M. V.; JUNIOR, E. H. B.; TEIXEIRA, S. R.; LARA, M. C. C. S. H.; RIZZO, H.; ANGELINI, M.; MENEGHINI, R. C. M.; BENESI, F. J.

Ocorrência de artrite em ovinos causada por *Mycoplasma* spp. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 71, p. 233–235, 2004.

GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M. M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, L. E. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 576–584, 2009.

GUIMARAES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; TIMENETSKY, J.; BOWER, L. P.; STRAIT, E.; MESSICK, J. B. Identification of *Mycoplasma suis* antigens and development of a multiplex microbead immunoassay. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, v. 26, n. 2, p. 203–212, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24557752>>. Acesso em: 2 out. 2014.

HAMSTEN, C.; WESTBERG, J.; BÖLSKE, G.; AYLING, R.; UHLÉN, M.; PERSSON, A. Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, n. Pt 2, p. 539–549, fev. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227258>>. Acesso em: 2 out. 2014.

HEGDE, S.; GABRIEL, C.; KRAGL, M.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Sheep primary cells as in vitro models to investigate *Mycoplasma agalactiae* host cell interactions. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 7, p. ftv048, 2015. Disponível em: <<http://femspd.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femspd/ftv048>>.

HEGDE, S.; HEGDE, S.; SPERGSE, J.; BRUNTHALER, R.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. In vitro and in vivo cell invasion and systemic spreading of *Mycoplasma agalactiae* in the sheep infection model. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 304, n. 8, p. 1024–1031, 2014.

HOELZLE, K.; GRIMM, J.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; TORGERSON, P.; HAMBURGER, A.; WITTENBRINK, M. M.; HOELZLE, L. E. Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 12, p. 1616–1622, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

IBGE. **Estatística de Produção Pecuária. Banco de dados**, p. 6–7, 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=1>>.

IVERSON-CABRAL, S. L.; WOOD, G. E.; TOTTEN, P. A. Analysis of the *Mycoplasma genitalium* MgpB Adhesin to Predict Membrane Topology, Investigate Antibody Accessibility, Characterize Amino Acid Diversity, and Identify Functional and Immunogenic Epitopes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138244, 18 set. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0138244>>.

JORGE, S.; DE OLIVEIRA, N. R.; MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; HARTLEBEN, C. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 229–236, 2014.

KHIARI, A. B.; MARDASSI, B. B. A. Characterization of the antigenic and functional domains of a *Mycoplasma synoviae* variant vlhA gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3-4, p. 322–329, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.016>>.

KINDE, H.; DAMASSA, a. J.; WAKENELL, P. S.; PETTY, R. *Mycoplasma* Infection in a Commercial Goat Dairy Caused by *Mycoplasma Agalactiae* and *Mycoplasma Mycoides* Subsp. *Mycoides* (Caprine Biotype). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 423–427, 1 out. 1994. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879400600404>>. Acesso em: 2 out. 2014.

KORNSPAN, J. D.; ROTTEM, S. Phospholipase A and glycerophosphodiesterase activities in the cell membrane of *Mycoplasma hyorhinis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 332, n. 1, p. 34–39, 2012.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. . Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152613>><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600943158><http://ac.els-cdn.com/S0022283600943158/1-s2.0-S0022283600943158-main.pdf?_tid=207e48c4-9f55-11e5-aaee-00000aacb362&acdnat=1449762547_8e2000bc>.

KUMAR, A.; RAHAL, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K.; DHAMA, K. Mycoplasma agalactiae, an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. **Veterinary medicine international**, v. 2014, p. 286752, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4109668&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**. 2:2, 2006.

LEE, S. H.; LEE, S.; CHAE, C.; RYU, D.-Y. A recombinant chimera comprising the R1 and R2 repeat regions of M. hyopneumoniae P97 and the N-terminal region of A. pleuropneumoniae ApxIII elicits immune responses. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 43, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3932138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

LI, L.; KRISHNAN, M.; BASEMAN, J. B.; KANNAN, T. R. Molecular cloning, expression, and characterization of a Ca²⁺-dependent, membrane-associated nuclease of Mycoplasma genitalium. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 4876–4884, out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2944508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

LI, M.; MA, C. J.; LIU, X. M.; ZHAO, D.; XU, Q. C.; WANG, Y. J. Molecular cloning of HSP70 in Mycoplasma ovipneumoniae and comparison with that of other mycoplasmas. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 2, p. 834–848, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21574140>>. Acesso em: 2 out. 2014.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T.; MCWILLIAM, H.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; LOPEZ, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic acids research**, v. 43, p. 580–584, 2015. Disponível em: <<http://europepmc.org/articles/PMC4489272/?report=abstract>>.

LORIA, G. R.; NICHOLAS, R. A. J. Contagious agalactia: The shepherd's nightmare. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 5–6, out. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023313003018>>.

LORIA, G. R.; SAMMARTINO, C.; NICHOLAS, R. a. J.; AYLING, R. D. In vitro

susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin–spectinomycin. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 1, p. 3–7, ago. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528803000304>>. Acesso em: 2 out. 2014.

LYSNYANSKY, I.; YOGEV, D.; LEVISOHN, S. Molecular characterization of the *Mycoplasma bovis* p68 gene, encoding a basic membrane protein with homology to P48 of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 2, p. 234–242, 2008.

MADANAT, A.; ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 70, n. 4, p. 403–412, 2001.

MADRUGA, M. S.; ARRUDA, S. G. B.; ARAÚJO, E. M.; ANDRADE, L. T.; NASCIMENTO, J. C.; COSTA, R. G. Efeito da idade de abate no valor nutritivo e sensorial da carne caprina de animais mestiços. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000300014>>.

MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; JORGE, S.; GALLI, V.; HAESBROUCK, F.; MAES, D.; DELLAGOSTIN, O.; CONCEIÇÃO, F. R. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTB. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 166–171, 2014a.

MARCHIORO, S. B.; SANCHEZ, R. D. P.; MICHELIS, A.; HAESBROUCK, F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; MAES, D. Immune responses of a chimeric protein vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTB against experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs. **Vaccine**, v. 32, n. 36, p. 4689–4694, 2014b.

MARQUES, L. M.; UENO, P. M.; BUZINHANI, M.; CORTEZ, B. A.; NETO, R. L.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; GUIMARAES, A. M. S.; MONEZI, T. A.; BRAGA, A. C. R. J.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; TIMENETSKY, J. Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. **BMC microbiology**, v. 10, p. 1-8, 2010.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H. Caprinos no Brasil. **INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira**, p. 1–17, 2010.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. 597–600, 2013.

MESSICK, J. B.; SANTOS, A. P. Identification, bioinformatics analyses, and expression of immunoreactive antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 18, n. 8, p. 1275–1281, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

MOVAHEDI, A.; HAMPSON, D. J. New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. **Veterinary Microbiology**. 131, 1–13, 2008.

MUDADU, M. A.; CARVALHO, V.; LECLERCQ, S. Y. Nonclassically Secreted Proteins as Possible Antigens for Vaccine Development: A Reverse Vaccinology Approach. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V 175, 7, pp 3360-3370, 2015.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends Biochem Sci**. 24:34–36, 1999.

NASCIMENTO, N., C.; SANTOS, A. P.; CHU, Y.; GUIMARAES, A. M. S.; BAIRD, A. N.; WEIL, A. B.; MESSICK, J. B. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. **Veterinary Research**. 45:86, 2014.

NICHOLAS, R. A. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. **Small Ruminant Research**, v. 45, n. 2, p. 145–149, ago. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448802000950>>.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; LORIA, G. R. Ovine mycoplasmal infections. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1-2, p. 92–98, abr. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448807002829>>. Acesso em: 2 out. 2014.

NOUVEL, L. X.; MARENDIA, M.; SIRAND-PUGNET, P.; SAGN??, E.; GLEW, M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; BARR??, A.; CLAVEROL, S.; CITTI, C. Occurrence, plasticity, and evolution of the vpma gene family, a genetic system devoted to high-frequency surface variation in *Mycoplasma agalactiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 13, p. 4111–4121, 2009.

OIE. CONTAGIOUS AGALACTIA. In: **OIE Terrestrial Manual 2013, Chapter 2.7.5. — Contagious agalactia**. [s.l: s.n.]p. 1–9.

OIE. **OIE World Animal Health Information System WAHIS : Protecting animals , preserving our future**. Disponível em: <<http://www.oie.int/>>.

OPITZ, O.; JACOBS, E. Adherence epitopes of *Mycoplasma genitalium* adhesin. **Journal of general microbiology**, v. 138, n. 9, p. 1785–1790, 1992.

PAETZEL, M.; KARLA, A.; STRYNADKA, N. C. J.; DALBEY, R. E. Signal peptidases. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4549–4579, 2002.

PATERNA, A.; SÁNCHEZ, A.; AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C. Survival of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies capri in heat treated goat colostrum. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 196, n. 2, p. 263–265, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154071>>. Acesso em: 2 out. 2014.

PENHA, A. M.; D'APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, p. 299–301, 1942.

PEREIRA, L. M. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>. **Nature Methods**, 8:785-786, 2011.

PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; JOHANSSON, K.-E. Phylogeny of Some Mycoplasmas from Ruminants Based on 16S rRNA Sequences and Definition of a New Cluster within the Hominis Group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 1093–1098, 1 out. 1996. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00207713-46-4-1093>>.

PONOMARENKO, J. V.; BOURNE, P. E. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. **BMC Structural Biology**. n. 7, v. 64, p. 1 - 19, 2007.

POUMARAT, F.; LE GRAND, D.; GAURIVAUD, P.; GAY, E.; CHAZEL, M.; GAME, Y.; BERGONIER, D. Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by *Mycoplasma agalactiae*. **BMC veterinary research**, v. 8, p. 109, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3439703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

PRATS-VAN DER HAM, M.; TATAY-DUALDE, J.; DE LA FE, C.; PATERNA, A.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; CONTRERAS, A.; GÓMEZ-MARTÍN, Á. Presence of *Mycoplasma agalactiae* in semen of naturally infected asymptomatic rams. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 791–794, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16001059>>.

RAZIN, S. *Mycoplasma* Taxonomy Studied by Electrophoresis of Cell Proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 3, p. 687–694, 1968.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002, 589 p.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Review Article *Mycoplasma* adhesion. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 407–422, 1992.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1998.

RELICH, R. F.; BALISH, M. F. Insights into the function of *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 from orthologous gene replacement. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2862–2870, 2011.

ROBINO, P.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; CHESSA, B.; MICILETTA, M.; NEBBIA, P.; LE GRAND, D.; ROSATI, S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 201–209, 2005.

ROMERO-ARROYO, C. E.; JORDAN, J.; PEACOCK, S. J.; WILLBY, M. J.; FARMER, M. A.; KRAUSE, D. C. *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 is required for cytodherence and associated with proper cell development. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1079–87, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

ROSATI, S.; POZZI, S.; ROBINO, P.; MONTINARO, B.; CONTI, a; FADDA, M.; PITTAU, M. P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a malp product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. **Infection and immunity**, v. 67, n. 11, p. 6213–6216, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97020&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ROSATI, S.; ROBINO, P.; FADDA, M.; POZZI, S.; MANNELLI, a; PITTAU, M. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. **Veterinary microbiology**, v. 71, n. 3-4, p. 201–210, fev. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10703704>>.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 417–432, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663864>>.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 436–440, 1998.

SALMAN, M.; ROTTEM, S. The cell membrane of *Mycoplasma penetrans*: lipid composition and phospholipase A1 activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1235, n. 2, p. 369–377, maio 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527369580026C>>. Acesso em: 9 abr. 2016.

SANTONA, A.; CARTA, F.; FRAGHÍ, P.; TURRINI, F. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 171–176, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SCHMIDT, J. A.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, P. F. *Mycoplasma hyopneumoniae*

mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3414–3424, 2007.

SCHURWANZ, N.; JACOBS, E.; DUMKE, R. Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of *Mycoplasma pneumoniae* for vaccine development. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5007–5015, nov. 2009.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

SHIBATA, K. I.; SASAKI, T.; WATANABE, T. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 4174–4177, 1995.

SHIO, M. T.; HASSAN, G. S.; SHAH, W. A.; NADIRI, A.; EL FAKHRY, Y.; LI, H.; MOURAD, W. Coexpression of TLR2 or TLR4 with HLA-DR potentiates the superantigenic activities of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 6, p. 2543–2550, 2014.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.

Disponível em: <<http://msb.embopress.org/content/7/1/539.abstract>>.

SILVA, F. L. R. Da; ARAÚJO, A. M. De. Desempenho produtivo em caprinos mestiços no semi-árido do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1028–1035, 2000.

SILVA, N. S.; AZEVEDO, E. O.; CAMPOS, A. C.; CORDEIRO, A. A.; MAMEDE, A. G.; SILVA, R. B. S.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, E. R.; MARINHO, M. L. Infecção congênita em cabritos por *Mycoplasma agalactiae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 631–634, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v66n2/44.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2015.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MAREND, M.; JACOB, D.; BARRÉ, A.; BARBE, V.; SCHENOWITZ, C.; MANGENOT, S.; COULOUX, A.; SEGURENS, B.; DE DARUVAR, A.; BLANCHARD, A.; CITTI, C. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. **PLoS genetics**, v. 3, n. 5, p. e75, 18 maio 2007. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

SOLSONA, M.; LAMBERT, M.; POUMARAT, F. Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 45–58, maio 1996. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810007>>.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences.

Proceedings/ International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, v. 6, p. 175–182, 1998.

STOTHARD, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **BioTechniques**. 28: 1102-1104, 2000.

SUN, P.; JU, H.; LIU, Z.; NING, Q.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; HUANG, Y.; MA, Z.; LI, Y. Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 6, p. 1-6, 2013.

SVENSTRUP, H. F.; NIELSEN, P. K.; DRASBEK, M.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 361–373, 2002.

SWINGLER, G. H.; MICHAELS, D.; HUSSEY, G. G. Conjugate vaccines for preventing *Haemophilus influenzae* type B infections. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. 1-16, 2007.

TALUKDAR, S.; ZUTSHI, S.; PRASHANTH, K. S.; SAIKIA, K. K.; KUMAR, P. Identification of Potential Vaccine Candidates Against *Streptococcus pneumoniae* by Reverse Vaccinology Approach. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 172, p. 3026–3041, 2014.

TARDY, F.; BARANOWSKI, E.; NOUVEL, L.-X.; MICK, V.; MANSO-SILVÀ, L.; THIAUCOURT, F.; THÉBAULT, P.; BRETON, M.; SIRAND-PUGNET, P.; BLANCHARD, A.; GARNIER, A.; GIBERT, P.; GAME, Y.; POUMARAT, F.; CITTI, C. Emergence of atypical *Mycoplasma agalactiae* strains harboring a new prophage and associated with an alpine wild ungulate mortality episode. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4659–4668, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3370481&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

TOLA, S.; ANGIOI, a; ROCCHIGIANI, a M.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; GALLERI, G.; LEORI, G. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. **Veterinary microbiology**, v. 54, n. 1, p. 17–22, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050167>>.

TOLA, S.; CROBEDDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 1, p. 45–50, 7 ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506906>>.

TOLA, S.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; CASCIANO, I.; ROCCHIGIANI, A. M.; ANGIOI, A.; LEORI, G. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 143, n. 2-3, p. 259–265, 1996.

TOLA, S.; MANUNTA, D.; ROCCA, S.; ROCCHIGIANI, a M.; IDINI, G.; ANGIOI, P.

P.; LEORI, G. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 22, p. 2764–2768, 16 jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438045>>.

TSIRIGOS, K. D.; PETERS, C.; SHU, N.; KÄLL, L.; ELOFSSON, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W401–W407, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4489233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

UENO, P. M.; TIMENETSKY, J.; CENTONZE, V. E.; WEWER, J. J.; CAGLE, M.; STEIN, M. A.; KRISHNAN, M.; BASEMAN, J. B. Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: Evidence for nuclear localization. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3033–3041, 2008.

VAN DER MERWE, J.; PRYSLIAK, T.; PEREZ-CASAL, J. Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by *Mycoplasma bovis*. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4570–4578, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2976333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

VARSHNEY, A. K.; CHAUDHRY, R.; KABRA, S. K.; MALHOTRA, P. Cloning, expression, and immunological characterization of the P30 protein of *Mycoplasma pneumoniae*. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 15, n. 2, p. 215–220, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2238052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

VERBISCK, G.; GONZALEZ-CANDELA, M.; CUBERO, M. J.; LEON, L.; SERRANO, E.; PERALES, A. *Mycoplasma agalactiae* in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in Spain. **Veterinary Record**, v. 167, n. 11, p. 425–426, 11 set. 2010. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.c4908>>.

VERBISCK-BUCKER, G.; GONZÁLEZ-CANDELA, M.; GALIÁN, J.; CUBERO-PABLO, M. J.; MARTÍN-ATANCE, P.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* infection in free-ranging Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Andalusia, southern Spain. **Journal of wildlife diseases**, v. 44, n. 2, p. 369–280, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436669>>.

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

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4238–44, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=101734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

XIONG, Q.; WANG, J.; JI, Y.; NI, B.; ZHANG, B.; MA, Q.; WEI, Y.; XIAO, S.; FENG, Z.; LIU, M.; SHAO, G. The functions of the variable lipoprotein family of *Mycoplasma*

hyorhinis in adherence to host cells. **Veterinary Microbiology**, v. 186, p. 82–89, 2016. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113516300177>>.

YOSHIDA, S.; FUJISAWA, a; TSUZAKI, Y.; SAITOH, S. Identification and expression of a *Mycoplasma gallisepticum* surface antigen recognized by a monoclonal antibody capable of inhibiting both growth and metabolism. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3186–3192, jun. 2000. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELL, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J.; BRINKMAN, F. S. L. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**. v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010.

ZEN, S.; SANTOS, M. C.; MONTEIRO, C. M. Evolução da caprino e ovinocultura. **Ativos ovinos e caprinos**, v. 1, p. 8-11, 2014.

APÊNDICE A - Caracterização dos soros de caprinos provenientes de propriedades da região sudoeste do estado da Bahia

(continua)

Animal	Propriedade	Sexo	Sintomatologia clínica	Deteção de <i>Mollicutes</i> por PCR	Média da densidade óptica entre os soros de caprinos e a proteína recombinantes P40
1	A	F^a	Artrite	NR^c	0,753
2	A	M ^b	Artrite	NR	0,655
3	A	F	Rigidez nos membros	NR	0,297
4	A	M	Artrite	NR	0,501
5	A	F	Artrite	NR	0,355
6	A	F	Artrite	NR	0,351
7	A	F	Artrite	NR	0,448
8	A	M	Edema articular	NR	0,399
9	B	F	CMT ^d positivo	Positivo	0,697
10	B	F	CMT positivo	Positivo	0,525

(continua)

Animal	Propriedade	Sexo	Sintomatologia clínica	Deteção de <i>Mollicutes</i> por PCR	Média da densidade óptica entre os soros de caprinos e a proteína recombinantes P40
11	B	F	CMT positivo	Positivo	0,389
12	B	F	CMT positivo	Positivo	0,263
13	B	F	CMT positivo	Positivo	0,490
14	C	F	CMT positivo	Negativo	0,739
15	C	F	Ausente	Negativo	0,476
16	C	F	Conjuntiva genital Hiperêmica e CMT positivo	Negativo	0,495
17	C	F	CMT positivo	Negativo	0,648
18	C	F	CMT positivo	Positivo	1,036
19	C	F	Ausente	Positivo	0,468
20	D	F	Conjuntiva ocular hiperêmica e edema articular	Negativo	0,637
21	D	F	Conjuntiva genital Hiperêmica e edema articular	Positivo	0,404
22	D	NI ^e	Ausente	Positivo	0,477

(continua)

Animal	Propriedade	Sexo	Sintomatologia clínica	Deteccção de <i>Mollicutes</i> por PCR	Média da densidade óptica entre os soros de caprinos e a proteína recombinantes P40
23	D	M	Conjuntiva ocular Hiperêmica	Negativo	0,421
24	E	M	Ausente	Negativo	0,388
25	E	NI	Ausente	Positivo	0,613
26	F	NI	CMT positivo	Positivo	0,747
27	F	NI	Conjuntiva ocular e genital hiperêmica e CMT positivo	Positivo	0,297
28	F	NI	Conjuntiva ocular e genital hiperêmica e CMT positivos	Positivo	0,367
29	G	NI	CMT positivos	Positivo	0,342
30	G	NI	Ausência de sinais clínicos	Positivo	0,516
31	G	NI	Conjuntiva ocular Hiperêmica e CMT positivo	Positivo	0,546
32	H	NI	Conjuntiva ocular pálida, glândula mamária hiperêmica e CMT positivo	Negativo	0,695

(conclusão)

Animal	Propriedade	Sexo	Sintomatologia Clínica	Deteção de <i>Mollicutes</i> por PCR	Média da densidade óptica entre os soros de caprinos e a proteína recombinantes P40
33	H	NI	Ausência de sinais clínicos	Negativo	0,640
34	H	NI	Conjuntiva ocular pálida	Positivo	0,290
35	I	NI	CMT positivo	Positivo	0,815
36	J	NI	CMT positivo	NR	0,388

Notas: ^a F: Animal fêmea;
^b M: Animal macho;
^c NR: positividade confirmada apenas pela clínica;
^d CMT: Califórnia mastite test
^e NI: Não informado

APÊNDICE B - Alinhamento entre os ortólogos da proteína WP_011949418.1 (P40)

		Cobertura (%)/ Identidade (%)
<i>M. agalactiae</i> WP_011949418.1	MKTNRKILFGLLTASSFTAVPLLAACDDKNENSQKNPQDNGDKVEKQALGEVVKNTNLG	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949417.1	MKMNRKILVGLLATSSFTTVPLLAACGGT-----QELNEVIKTLNLG	(100/40)
<i>M. bovis</i> WP_013954686.1	MKMNRKILFSISAISSVATVPLLAACGNT-----QGLDKVIKTLNLG	(100/36)
<i>M. bovis</i> WP_041309154.1	-----SSVATVPLLAACGNT-----QGLDKVIKTLNLG	(96/36)
	.:**. * *:***. ***	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949418.1	EIVLPKDKE--IPEASSILESIVKTN---ATVDTSELEVSNIILKNGATVSAKKESKKYS	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949417.1	EIKIYEDQKIEVPTAEIILSALTKVNDSEKVKVDVTQLEVKEIKANQAIVEAKKDSKTYK	
<i>M. bovis</i> WP_013954686.1	EINVYEDLKLDTPGEKHILNALAKANDTKEVKIDLSQLEAKDIKSTGAVIEAKKDSKLYS	
<i>M. bovis</i> WP_041309154.1	EINVYEDLKLDTPGEKHILNALAKANDTKEVKIDLSQLEAKDIKSTGAVIEAKKDSKLYS	
	** : : * . **.:*.*. . : * : **.: * . * :.***:* * .	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949418.1	GSINVTFTIKKSDDVVAKKDLSKVNKDNFKFLTNTFVFGSDLLEALKTDLELPNLKLDDFQ	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949417.1	GQVIVTYTLAKAK---RVDLATVKKENITGISNFTSDKEMANILKKELKLPNLSEKDFT	
<i>M. bovis</i> WP_013954686.1	GRIQVTFTSKKVK---RVDISTVKKENLSGISNYTGVKEMATILRKELSLPNLSEKDIT	
<i>M. bovis</i> WP_041309154.1	GRIQVTFTSKKVK---RVDISTVKKENLSGISNYTGVKEMATILRKELSLPNLSEKDIT	
	* : **:* * . : *.:*.*.*.*. :*: . : : *.:*.*.*.*. .*:	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949418.1	FTVDKLATADKEGKLVIEAKPTS KLITGTVILDIPRLVVKPTEENHNIADAKKLLDETLK	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949417.1	ISLESQATNDKEGKLVIKSAAFSKLIYGTLELVVPKLAIAENS-----NKKLVEESIA	
<i>M. bovis</i> WP_013954686.1	ITLDSAATNDKEGKLIVISNPDSENIFGKLEIVLPKLAPLGN-----NVKLVSEYIT	
<i>M. bovis</i> WP_041309154.1	ITLDSAATNDKEGKLIVISNPDSENIFGKLEIVLPKLAPLGN-----NVKLVSEYIT	
	: : : . ** * : : : : * : * * . : : : * . **.:* :	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949418.1	NLSILES KMDSNIKNIEKWEANTS-DGGVFTEEAKKIKDTSSQVKAKFKEAKTKVEMLIK	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949417.1	KFKKEAEKTVANLKNIKWEAIDESKKEEFNKKVEKIKEIANKLKDKYTKTYEKLEKAIAIK	
<i>M. bovis</i> WP_013954686.1	KFKAQAKKMEDNLRNITKWEASEESKKQEFENLATKIKEVATKLKDKYTKTVEKLEQAIAIK	
<i>M. bovis</i> WP_041309154.1	KFKAQAKKMEDNLRNITKWEASEESKKQEFENLATKIKEVATKLKDKYTKTVEKLEQAIAIK	
	: . . * * : ** * . . * : . ***: : : * * : : : * * *	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949418.1	DKTKLSDEEIKSANKIINDFIAYYFTEVSKSDTGKIIYDGENTMRDIKKIAKLKNGNQEKDSLIEF	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949417.1	DKSDVDDNAFNELNTEISLVTVTYNSTVKLVNEK-ETDYTKVMEELKKLGKLKNGAKEADILIDF	
<i>M. bovis</i> WP_013954686.1	GKNDIDNDEFNKLNVDISLVSVAYDSAVKPKVNGKVTTDYTKIMKDLKKVAKPKDGSKEAEISIDF	
<i>M. bovis</i> WP_041309154.1	GKNDIDNDEFNKLNVDISLVSVAYDSAVKPKVNGKVTTDYTKIMKDLKKVAKPKDGSKEAEISIDF	
	* . : : : . * * . . * : * * * . * * : * . : * : * * * : * * :	

APÊNDICE C - Alinhamento entre os ortólogos da proteína WP_011949336.1.

		Cobertura (%)/ Identidade (%)
<i>M. agalactiae</i> WP_011949336.1	MNKVNKKFLTAMGGGGIITSLALPIVAASCDNKAKNEQPKN-----NIDDLPNDDSNNNNV	
<i>M. bovis</i> WP_013456318.1	MNKVNKKFLTVMGGGGIITSLALPIVAACNNKNQKETGKENKNKNIVDTIPSDNTHSANN	98/33
<i>M. bovis</i> AMW25490.1 (P48)	MNKVNRKFLTAMGGGGIITSLALPIVAALCNNKNQKETGKENKNKNIADTIPSDNTHSANN	99/30
	*****:****.***** *:* * : * * : * : * : * : * : *	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949336.1	DNNKDS-----TSAS---I--SMNESG---AKSETVENSNSHTTRNVSNKDMKDTKI	
<i>M. bovis</i> WP_013456318.1	SSSESDKSKNADNSNSNSNSNVNNSANNSSSESDKSKNADNSNSNSNSNVNNSNADNHNSI	
<i>M. bovis</i> AMW25490.1 (P48)	SSSESDKSKNADNSNSNSNSNV-----NNSPDNHNSI	
	...:.. . * * : . * . : ... *	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949336.1	SKE-----SEASIYLYEKWGCDIYKFDPNSP-----NFKKPKD-----NSQTD	
<i>M. bovis</i> WP_013456318.1	KSDTENTERSSSDNKNMQUIHKYG-----LKIINEKVE	
<i>M. bovis</i> AMW25490.1 (P48)	KSDTENTERSSSDNKSNDNVKTNHPNDRA-ADPKNGNQESSNLIAPVLEKEYFKILN-HVH	
	..: . : . : * : ..	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949336.1	APSRITNESNTVSFSSFNPEFKKYLTETY-----TFWNELKAFVIAVSKSKDQELLRKY	
<i>M. bovis</i> WP_013456318.1	DSVKITT-----IDSELKDFILKV-----EFYNELTPLVIKL-KSKDIDTKRKH	
<i>M. bovis</i> AMW25490.1 (P48)	DAIQILK--KTHGNNPKTRELDEILSSYQPKKLEKTLDYLTSLMVEI-AKKDYGFNSHF	
	: * . * : . : : * . : : : . ** : .	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949336.1	QKHFELWKIIDQIIQSVTLNPNKGDSLQEQFKDSETRDHLHNLNKSIED-IRSEVNDFVKKLNKK	
<i>M. bovis</i> WP_013456318.1	NDIFKFWKEFGKIIDSKSL-----LNEIFKKEDEKAALLEYNKEYESKTRSKVLELIKQI---	
<i>M. bovis</i> AMW25490.1 (P48)	GEDFNRWHTNNVN-----DLDW-----KVRN-QLNVITSILDK	
	. * : * : : * . : : : :	

APÊNDICE D - Alinhamento entre ortólogos da proteína WP_011949770.1

		Cobertura (%)/ Identidade (%)
<i>M. agalactiae</i> WP_011949770.1 <i>M. bovis</i> WP_013456028.1	MKSKFLMTLPVLFTFPPIVSASCTDINQNNSTAENKKPDSNEKIKVDNATTNNANSNENKN MKSKFLMTLPALISLPIISATCTNVNQNNASSETKKPNANNKSQNDKIIVHNGSTNEDDN *****.*:::***:***:***:*****:*.***:***: * : * : ..*...***.*	99/37
<i>M. agalactiae</i> WP_011949770.1 <i>M. bovis</i> WP_013456028.1	-----DGR-----SKTEQPSKDQAETYSTSNVNKQKEEMLKKLKEELP KINNDQSKPGQNNGTNTNNNNTMPNENATPSPNSNKDDSNSQDNEQNKQMLTKLEKELT :* ** :. : *.*: *:***:***.***:***	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949770.1 <i>M. bovis</i> WP_013456028.1	KLKEKKVELEKTIEETKPTTEEQLKKAWQDIENKANTSPSEYDESKLKEAYEKWLTVYDKL DLRAKKAEELEKTVNENS DKVKQLEDEYQKIEKELVEKNSQDLNTKLMEKYNEYEALYSKV .*: **.*****:*. . :***. :*.***: . *: :*** * *::: :*.**:	
<i>M. agalactiae</i> WP_011949770.1 <i>M. bovis</i> WP_013456028.1	TNAKNELEILTKSKMIEQTEQAIEKLETKLKAK TQAKNDLEIINKDMLIENLEKQVTELKNKIKT- *:***:***:*. :*: * : :*:***:	