

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MAYSA SANTOS BARBOSA

**Proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae* atuam como adesinas,
interagem com proteínas do hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2021

MAYSA SANTOS BARBOSA

**Proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae* atuam como adesinas,
interagem com proteínas do hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Versão corrigida

São Paulo
2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos Barbosa, Maysa
Proteínas de superfície de Mycoplasma agalactiae
atuam como adesinas, interagem com proteínas do
hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA / Maysa
Santos Barbosa; orientador Jorge Timenetsky. --
São Paulo, 2021.
114 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mollicutes. 2. Proteínas de membrana. 3.
Adesão. 4. Matriz extracelular. 5. Dano ao DNA. I.
Timenetsky, Jorge , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maysa Santos Barbosa

Titulo da Dissertação/Tese: Proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae* atuam como adesinas, interagem com proteínas do hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA.

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:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Caracterização funcional e avaliação da antigenicidade e imunogenicidade de proteínas recombinantes de Mycoplasma agalactiae*", registrado sob o protocolo nº **123/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Jorge Timenetsky**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Maysa Santos Barbosa (Pós-graduando), Cristina Kraemer Zimpel (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Functional characterization and evaluation of the antigenicity and immunogenicity of Mycoplasma agalactiae recombinant proteins*", protocol nº **123/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12:00:00 AM** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Jorge Timenetsky**

- Team members: *Maysa Santos Barbosa (Graduate Student), Cristina Kraemer Zimpel (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Oryctolagus cuniculus</i>		<i>Macho/Male</i>	<i>6 meses/months</i>	<i>8</i>

São Paulo, 17 de março de 2017.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização funcional e avaliação da antigenicidade e imunogenicidade de proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae*”, registrada com o nº 944/2017, sob a responsabilidade de Jorge Timenetsky e Maysa Santos Barbosa - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 11.10.2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 25-09-2017 Término: 31-08-2018
Espécie/linhagem/raça	Coelho
Nº de animais	08
Peso/Idade	5 meses
Sexo	fêmeas
Origem	Biotério da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 11 de Outubro de 2017



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

À minha família, especialmente à
minha mãe.

Aos amigos, por todo o suporte e
rede de apoio, que de alguma
forma me ajudaram durante todo o
caminho.

Sou grata a todos!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos n. 2016/23306-6, 2017/25686-3, 2019/03425-9.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia.

Aos meus pais, em especial à minha mãe, Neide, ao meu irmão, Joilton, pelo apoio direto ou indireto, mesmo em momentos difíceis, me fortalecendo durante todos os anos longe de casa. Sou grata a vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timenetsky, uma pessoa iluminada, exemplo de ser humano e pesquisador. Obrigada pela oportunidade, pela compreensão, pelo conhecimento e carinho compartilhado. Sou ainda mais apaixonada pelos micoplasmas.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, por estar sempre presente durante a minha trajetória acadêmica, pela confiança e por todo ensinamento compartilhado ao longo de tantos anos. Obrigada por todo incentivo, apoio e convivência. Agradeço por me ajudar a abrir novas portas e me ajudar a realizar sonhos. Serei eternamente grata.

À Aricelma França, Celminha, por toda experiência e conhecimento compartilhado. Obrigada pela paciência em ensinar, por toda disponibilidade em ajudar mesmo que à distância. Agradeço a amizade, as conversas e os cafés, tenham sido eles nos momentos alegres e, em especial, nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. Rohini Chopra-Dewasthaly por abrir as portas de seu laboratório no Instituto de Microbiologia da University of Veterinary Medicine Vienna (Vetmeduni) – Áustria para realização dos experimentos em cultura de células, sou grata pela orientação e pelo apoio. À Profa. Dra. Monika Ehling-Schulz chefe do Instituto de Microbiologia da Vetmeduni. Às secretárias do instituto Eva Petri e Karin Gnasmüller e a todos os técnicos que auxiliaram de alguma forma no desenvolvimento do estudo durante a BEPE em Vetmeduni. Também agradeço à Katja e à Saskia pelo tempo e conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos por abrir as portas do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) para o desenvolvimento de alguns experimentos realizados nesse trabalho. Obrigada a todos do LDV que me ajudaram de alguma forma, principalmente Eduardo, Samuel, Lenon, Rubens, Mônica e Robert.

À Profa. Ana Marcia de Sá Guimarães por ter aberto as portas do Laboratório de Micobactérias (LAPAM) para o cultivo de cultura de células. Agradeço todos conselhos, apoio e disponibilidade em ensinar.

Aos professores Prof. Dr. Benedito Correia e Profa. Dra. Marilis Marques por terem cedido a utilização dos equipamentos para execução dos ensaios de expressão gênica.

Aos amigos do Laboratório de Micoplasmas, Aline, Camila, Guilherme, Izadora, Natália, Régis e Verena. Obrigada por toda ajuda no laboratório e pela ajuda emocional. Agradeço todos os momentos de descontração, os almoços no restaurante universitário, as idas para comer pastel na feira e ao espetinho no fim do dia, nossos cafés e comemorações na salinha. Obrigada pela rede de apoio e alívio emocional.

Aos amigos companheiros de casa, Abrahão, Aline, Izadora e Verena. Obrigada pela amizade, apoio, almoços de domingo e por fazerem de nosso apartamento meu lar durante a maior parte desses anos em São Paulo.

À Driu, Karina e Priscila. Obrigada pela amizade e por me abrigarem sempre que precisei, seja no pós balada ou no pós experimento. Vocês foram importantes ao longo da minha jornada em São Paulo, com vocês iniciei e finalizei um ciclo. Que venham os próximos!

À Cris, Mara e Taiana por me abrigarem em São Paulo seja durante o Natal ou pré viagens.

Aos amigos do Laboratório de Micobactérias (LAPAM), Alexandre, Antônio, Camila, Cristina, Giovanni, Felipe, Kerstin, Naila e Taiana. Obrigada a todos pela atenção, companherismo e disposição em me ajudar sempre que necessitei. Agradeço pela amizade além dos muros do ICB.

Aos amigos conterrâneos do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, em especial Samuel, Rubens, Lenon, Mariângela, Patrícia, Karine, Natiele, Jamile, Alexia, Tácita, Robert, Bianca, Helic e Dalva. Obrigada por todo acolhimento e por levar uma pouca da Bahia para São Paulo.

Aos amigos de longa data Dreike, Kamila, Ricardo, Sabine, Sabrina e Alana, por compartilharem comigo tantos momentos importantes, alegres ou tristes, e me apoiarem mesmo à distância.

À Johanna Natália, essencial durante todo período de imersão em Viena, compartilhando não apenas os momentos alegres, mas também me apoiando nos momentos tristes e de desespero. Agradeço também toda a sua família pelo apoio e acolhimento, em especial à Mônica, Patricio, María, Malena e Lisa-Marie. Aos novos amigos, Adaya, Cristina, Fernan e Verónica, por estarem presentes. Obrigada por deixar mais leve meu tempo na Europa.

Aos colegas e amigos do Projeto Micro do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (IMS/CAT), em especial ao pessoal do grupo de proteínas recombinantes Beatriz, Bruna, Manoel, Lucas Santana, Camila e Júlio por todo conhecimento e experiência compartilhados.

Aos secretários do departamento de microbiologia/ pós-graduação do ICB II, Naíde, Renato, Vânia e Isabel, pela atenção, paciência e por serem tão prestativos ao longo destes anos. Agradecimento especial à Gisele por todo auxílio e disponibilidade em resolver qualquer problema e esclarecer todas as dúvidas.

Aos funcionários da sala de esterilização, biblioteca, portaria, segurança, manutenção e limpeza do ICB II.

Aos demais amigos e familiares não citados e que ao longo dos últimos anos me apoiaram e enviaram pensamentos positivos. Muito obrigada!

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

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se
pôs a caminhar”

Paulo Freire

RESUMO

BARBOSA, M. S. **Proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae* atuam como adesinas, interagem com proteínas do hospedeiro e ativam vias de dano ao DNA.** 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Agalaxia contagiosa (AC) afeta pequenos ruminantes, é classificada pela *World Organisation for Animal Health* (OIE) como doença de notificação obrigatória devido ao impacto econômico significativo sobre a produção de ovinos e caprinos. *Mycoplasma agalactiae* é o principal causador dessa doença e apesar do progresso nos estudos sobre métodos diagnósticos, terapêuticos e de prevenção, as estratégias ainda permanecem ineficientes no controle da AC. O presente estudo teve como objetivo caracterizar funcionalmente proteínas de membrana de *M. agalactiae* como adesinas e avaliar a interação destas com moléculas e células do hospedeiro. Três proteínas de *M. agalactiae* (P40 - controle positivo -, MAG_1560 e MAG_6130), caracterizadas *in silico* como proteínas da membrana antigênicas, foram expressas em *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) *One Shot* e purificadas em uma coluna de afinidade. Posteriormente, coelhos foram imunizados com proteínas recombinantes para a produção de anticorpos policlonais. A localização das proteínas no micro-organismo foi avaliada por *colony blotting* e *western blotting* após fracionamento da fase TX-114. Para avaliar se as proteínas recombinantes são adesinas, foram realizados ensaios de adesão à células HeLa e estromais mamárias primárias de ovelhas (*sheep primary mammary stromal cells* - MSC). Os resultados obtidos confirmaram MAG_1560 e MAG_6130 como lipoproteínas, como a citoadesina P40. As proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130 também demonstraram citotoxicidade ao diminuir a viabilidade celular e aumentar a expressão de genes relacionados às vias de reparo do DNA e genes pró-apoptóticos. Para avaliar a interação destas proteínas com moléculas do hospedeiro realizou-se ensaio de adesão ao plasminogênio, fibrinogênio, lactoferrina e fibronectina. Além disso, este estudo demonstrou que as proteínas MAG_6130 e MAG_1560 tem capacidade de aderir às células eucarióticas e a adesão dessas proteínas às células pode ser inibida por anti-soro específico por ao menos uma metodologia. Além disso, P40 interage significativamente com plasminogênio, e em geral, P40, MAG_6130 e MAG_1560 exibiram ligação significativa à lactoferrina, fibrinogênio e fibronectina, uma característica que poderia potencialmente apoiar o patógeno na colonização do hospedeiro, migração de tecido e evasão imune. Ainda assim, mais estudos serão necessários para estabelecer mais claramente a relação entre P40, MAG_1560 e MAG_6130 e seus efeitos no

hospedeiro. Dessa forma, demonstra-se que essas proteínas estão envolvidas na citoadesão e contribuem para a patogenicidade bacteriana das células hospedeiras. Entretanto, ainda não está claro como essas proteínas ativam o sistema imune e qual a via de reparo de DNA é ativada. Os resultados deste estudo contribuem na melhor compreensão da função das moléculas de superfície em micoplasmas e o papel destas durante a infecção.

Palavras-chaves: *Mollicutes*. Proteínas de membrana. Adesão. Matriz extracelular. Dano ao DNA.

ABSTRACT

BARBOSA, M. S. **Surface proteins from *Mycoplasma agalactiae* act as adhesins, interact with host proteins and activate DNA damage pathways.** 2021. 114 p. Thesis (Ph.D. thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Contagious agalaxia (CA) affects small ruminants and is classified by the World Organization for Animal Health (OIE) as a notifiable disease due to its significant economic impact on livestock. *Mycoplasma agalactiae* is the main cause of this disease and despite the progress in studies on diagnostic, therapeutic and prevention methods, strategies still remain ineffective in controlling CA. The present study aimed to functionally characterize *M. agalactiae* membrane proteins as adhesins and evaluate their interaction with host molecules and cells. Three *M. agalactiae* proteins (P40 - positive control -, MAG_1560 and MAG_6130), characterized *in silico* as antigenic membrane proteins, were expressed in *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) *One Shot* and purified on affinity column. Subsequently, rabbits were immunized with recombinant proteins to produce polyclonal antibodies. The location of proteins in the microorganism was evaluated by colony blotting and western blotting after fractionation of the TX-114 phase. To assess whether the recombinant proteins are adhesins, adhesion assays to HeLa cells and sheep primary mammary stromal cells (MSC) were performed. The results obtained confirmed MAG_1560 and MAG_6130 as lipoproteins, such as the cytoadhesin P40. Proteins P40, MAG_1560 and MAG_6130 also demonstrated cytotoxicity by decreasing cell viability and increasing the expression of genes related to DNA repair pathways and pro-apoptotic genes. In order to assess whether these proteins interact with host molecules, adhesion to plasminogen, fibrinogen, lactoferrin and fibronectin was evaluated. Furthermore, this study demonstrated that MAG_6130 and MAG_1560 proteins have the ability to adhere to eukaryotic cells and the adhesion of these proteins to cells can be inhibited by specific antiserum using at least one methodology. P40 interacts significantly with plasminogen, and in general, P40, MAG_6130 and MAG_1560 exhibited significant binding to lactoferrin, fibrinogen and fibronectin, a feature that could potentially support the pathogen in host colonization, tissue migration and immune evasion. However, more studies are needed to more clearly establish the relationship between P40, MAG_1560 and MAG_6130 and their effects on hosts. Thus, it is shown that these proteins are involved in cytoadhesion and contribute to the bacterial pathogenicity of host cells, however, it is still unclear how these proteins activate the immune system and what is the induced DNA repair pathway. With the results of this study, we hope to

better understand the function of surface molecules in mycoplasmas and their role during infection.

Keywords: *Mollicutes*. Membrane proteins. Adhesion. Extracellular matrix. DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Micrografia eletrônica de micoplasmas	27
Figura 02 - Estrutura química de lipoproteínas	29
Figura 03 - Micrografia eletrônica da "organela de adesão" em <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ...	31
Figura 04 - Proteínas de adesão de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	32
Figura 05 - Interações entre plasminogênio, matriz extracelular e patógenos	35
Figura 06 - Perfil eletroforético das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	63
Figura 07 - Cinética da produção e purificação de IgG de anticorpos policlonais.....	65
Figura 08 - Análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais específicos anti-P40, anti-MAG_1560 e anti-MAG_6130	66
Figura 09 - Ensaio de afinidade para anticorpos policlonais IgG específicos contra as proteínas recombinantes de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	67
Figura 10 - Reconhecimento de lipoproteínas de <i>Mycoplasma agalactiae</i> com anticorpos policlonais específicos	68
Figura 11 - <i>Colony blotting</i> de colônias de <i>Mycoplasma agalactiae</i> transferidas para membrana de nitrocelulose e reconhecidas por anticorpos específicos	69
Figura 12 - Ensaios de adesão e inibição de adesão das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 à células HeLa por meio da metodologia de imunoenensaio	71
Figura 13 - Ensaios de adesão e inibição de adesão das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 à células MSC por meio da metodologia de imunoenensaio	72
Figura 14 - Adesão de <i>Mycoplasma agalactiae</i> PG2 em células HeLa.....	73
Figura 15 - Adesão de <i>Mycoplasma agalactiae</i> PG2 e GM139 em células HeLa e MSC	74
Figura 16 - Inibição da adesão de <i>Mycoplasma agalactiae</i> PG2 em células HeLa.....	74
Figura 17 - Interação das proteínas de membrana recombinantes P40, MAG_1560, MAG_6130 de <i>Mycoplasma agalactiae</i> à diferentes moléculas do hospedeiro.....	75
Figura 18 - Ensaio de viabilidade celular em diferentes concentrações de células HeLa e horas de incubação	77
Figura 19 - Ensaio de viabilidade celular em diferentes concentrações de células MSC e horas de incubação	78

Figura 20 - Ensaio de viabilidade celular após incubação das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de <i>Mycoplasma agalactiae</i> em células HeLa	79
Figura 21 - Ensaio de viabilidade celular após incubação das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de <i>Mycoplasma agalactiae</i> em células MSC.....	80
Figura 22 - Análise de expressão gênica: Genes regulados positivamente e regulados negativamente.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Proteínas em espécies de micoplasmas que possuem interações com componentes da matriz extracelular (MEC)	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

4CN - 4-chloro-1-naphthol

A - Absorbância

AC - Agalaxia Contagiosa

ANOVA - Análise de variância (*analysis of variance*)

BCA - Ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*)

BEND - Células de endométrio bovino (*bovine endometrial cells*)

BER - Reparo por excisão de bases (*base excision repair*)

BLF - Fibroblastos de pulmão de búfalo (*bovine lung fibroblast*)

BSA - Albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

cDNA - DNA complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CDS - Sequência codificadora (*coding sequence*)

CO₂ - Dióxido de carbono

Ct - Sinal de fluorescência que pode ser detectado (*Cycle Treshold*)

DDR - Resposta de dano ao DNA (*DNA Damage Response*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

D.O. - Densidade óptica

E - Coeficiente de extinção molar

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

g - Força G gravitacional

GC - Guanina e citosina

h - hora

His - Histidina

HR - Recombinação homóloga (*homologous recombination*)

HRP - Peróxido de hidrogênio oxidoreductase (enzima *horseradish peroxidase*)

ICE - Elemento integrativo e conjugativo (*integrating conjugative element*)

ICL - Ponte intercadeia (*interstrand crosslink*)

IgG - Imunoglobulina G

IL - interleucina

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (*isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside*)

KDa - Quilo Daltons

Kg - Quilograma

Kpb - Quilo pares de base

LAMP - Proteínas de membrana associadas a lipídios (*lipid-associated membrane proteins*)

LB - Luria Bertani

LPPs - Proteínas de membrana rica em serina

LPS - Lipopolissacarídeos

M - Molar

MBA - *Multiple-banded antigen*

MEC - Matriz extracelular

MIC - Concentração inibitória mínima

min - minuto

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MMEJ - Junção de extremidade mediada por micro-homologia (*microhomology-mediated end joining*)

MMR - Reparo do emparelhamento errôneo de DNA (*mismatch repair*)

MOI - Multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*)

mRNA - RNA mensageiro

MSC - Células mamárias estromais primárias de ovelhas (*sheep primary mammary stromal cells*)

N - Normal

NaCl - Cloreto de sódio

NER - Reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*)

ng - Nanograma

NHEJ - Junção de pontas não homólogas (*non-homologous end joining*)

nm - Nanômetro

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

OIE - *World Organisation for Animal Health*

OPD - *o-Phenylenediamine Dihydrochloride*

ORF - *Open Read Frame*

PAI - Inibidor do ativador de plasminogênio

pb - Pares de bases

PBS - Tampão fosfato (*phosphate buffered saline*)

pH - Potencial hidrogeniônico

PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

RNA - Ácido ribonucleico

rRNA - RNA ribossomal

psi - Libra força por polegada quadrada (*pound force per square inch*)

RT-qPCR - Reação da transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR em tempo real)

SDS - Dodecil- sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulphate*)

SDS - PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

TLR – Receptor do tipo *toll* (*toll like receptor*)

tPA - *Tissue-type plasminogen activator*

TBS - Tampão tris (*tris-buffered saline*)

TBST - Tampão tris com tween 20

UGA - Uracila, guanina e adenina

UGG - Uracila, guanina e guanina

UFC - Unidades formadoras de colônia

uPA - *urokinase-type plasminogen activator*

Vaa - Adesina variável associada à aderência

Vpmas - Proteínas variáveis de superfície de membrana (*variable surface membrane proteins*)

v/v - Relação volume/ volume

µg - Micrograma

µL - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Características biológicas do gênero <i>Mycoplasma</i>	27
2.2 Mecanismos de virulência e patogenicidade em micoplasmas	30
2.2.1 <i>Adesão à célula hospedeira</i>	30
2.2.2 <i>Proteínas de ligação à Matriz Extracelular</i>	33
2.2.3 <i>Proteínas de ligação a outras moléculas do hospedeiro</i>	34
2.2.4 <i>Mecanismos de evasão do sistema imune em micoplasmas</i>	37
2.3 <i>Mycoplasma agalactiae</i> e agalaxia contagiosa (AC)	38
2.4 Controle da agalaxia contagiosa	42
2.4.1 <i>Terapia antimicrobiana</i>	42
2.4.2 <i>Vacinologia</i>	43
2.5 <i>Mycoplasma agalactiae</i>	44
2.5.1 <i>Patogenicidade e proteínas de membrana de <i>Mycoplasma agalactiae</i></i>	46
2.6 Resposta ao dano no DNA (DNA Damage Response – DDR)	49
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivos gerais	52
3.2 Objetivos específicos	52
4 METODOLOGIA	53
4.1 Estirpes bacterianas, linhagens celulares e condições de cultura	53
4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	53
4.3 Avaliação da localização e expressão celular das proteínas recombinantes	54
4.3.1 <i>Produção de anticorpos policlonais</i>	54
4.3.1.1 <i>Avaliação da cinética dos anticorpos policlonais anti-proteínas recombinantes</i>	55
4.3.1.2 <i>Purificação dos anticorpos policlonais</i>	56
4.3.1.3 <i>Ensaio de avidéz à anticorpos IgG</i>	56
4.3.2 <i>Avaliação e confirmação da localização celular das proteínas recombinantes</i>	57
4.3.3 <i>Blotting das colônias de <i>M. agalactiae</i></i>	57
4.4 Avaliação das proteínas como adesinas microbianas	57
4.4.1 <i>Ensaio de adesão in vitro por imunoenensaio</i>	58
4.4.2 <i>Ensaio de adesão em cultura celular em monocamada</i>	58

4.5	Análise da interação ao plasminogênio, lactoferrina e componentes da matriz extracelular	59
4.6	Avaliação da citotoxicidade das proteínas recombinantes.....	59
4.6.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	59
4.6.2	<i>Análise da expressão gênica da via de dano ao DNA.....</i>	61
4.7	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	63
5.1	Expressão e purificação de proteínas recombinantes de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	63
5.2	Avaliação da localização e expressão celular das proteínas recombinantes	63
5.2.1	<i>Produção e purificação de anticorpos policlonais</i>	64
5.2.2	<i>Avaliação e confirmação da localização celular de proteínas de <i>M. agalactiae</i>.....</i>	67
5.2.3	<i>Blotting de colônias de <i>Mycoplasma agalactiae</i></i>	68
5.3	Avaliação das proteínas como adesinas microbianas.....	69
5.3.1	<i>Adesão de proteínas recombinantes de <i>M. agalactiae</i> à frações celulares de HeLa e MSC.....</i>	69
5.3.2	<i>Adesão de <i>Mycoplasma agalactiae</i> em culturas celulares de HeLa e MSC</i>	73
5.4	Análise da interação ao plasminogênio, lactoferrina e componentes da matriz extracelular	75
5.5	Avaliação do potencial citotóxico das proteínas recombinantes em células HeLa e MSC	76
5.5.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	76
5.5.2	<i>Análise da expressão gênica da via de dano ao DNA.....</i>	81
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE A - <i>Colony blotting</i> de colônias de <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> e <i>M. gallisepticum</i> immobilizadas em membrana de nitrocelulose	115
	Anexo A - Genes avaliados pelo Kit <i>Human DNA Damage Signaling Pathway</i> - <i>RT² ProfilerTM PCR Array</i> (Qiagen)	116
	Anexo B – Certificado do curso de Biossegurança	119
	Anexo C – Certificado do curso de Uso de Animais em Experimentação.....	120
	Anexo D – Certificado do curso Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos.....	121

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos da classe *Mollicutes*, ao contrário das bactérias típicas, não possuem parede celular, apresentam colesterol na membrana, possuem genoma reduzido e são considerados os menores organismos de vida livre. São, portanto, resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos e sobrevivem à lise osmótica em ambientes isotônicos. Os micoplasmas possuem especificidade aos hospedeiros e tecidos, provavelmente devido à sua exigência nutricional (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). São capazes de infectar mamíferos, aves, répteis, peixes, insetos e plantas. Nos animais, podem 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 espécies do gênero *Mycoplasma* ou *Ureaplasma* podem colonizar ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos), sendo alguns patogênicos e outros oportunistas (CHAZEL et al., 2010). Destaca-se a Agalaxia Contagiosa (AC), a qual é classificada pela *World Organisation for Animal Health* (OIE) como doença de notificação obrigatória, causada por várias espécies de micoplasmas: *M. agalactiae* (principal agente etiológico, responsável por mais de 80% das infecções), *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. putrefaciens*. Estima-se que os gastos com a AC atingem cerca de 30 milhões de dólares por ano em países europeus, principalmente em países com produção intensiva de ovelhas e cabras, tornando-se importante problema de saúde animal (AYLING et al., 2004; LORIA et al., 2003; NICHOLAS et al., 2008).

M. agalactiae é imóvel e possui entre 124-250 nm de diâmetro. Assim como outros micoplasmas, possui genoma reduzido (aproximadamente 880 Kpb), 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). Recentemente tem-se demonstrado a capacidade deste micoplasma em invadir *in vitro* diferentes células de ruminantes (HEGDE et al., 2014; HEGDE et al., 2015) e tem-se estabelecido a função das proteínas Vpmas (*variable surface membrane proteins* – proteínas variáveis de superfície de membrana) nesse processo (HEGDE et al., 2018).

A AC atinge pequenos ruminantes de ambos os sexos, adultos e jovens (principalmente). A doença tem sido descrita em diversos países, como Índia, Austrália, Turquia, Irã, Jordânia, Mongólia, Nigéria, Senegal, Iraque, Bulgária, Sérvia, Sudão, Rússia, Estados Unidos e Brasil,

porém possui maior impacto em países do Mar Mediterrâneo (LORIA et al., 2003; DE LA FE et al., 2005; AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008; CHAZEL et al., 2010; ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012; KUMAR et al., 2014). No Brasil, existem poucos estudos sobre a distribuição e prevalência de micoplasmas nesses animais. Em 2006 relatou-se pela primeira vez a AC em rebanhos caprinos nacionais, ocasionada por *M. agalactiae*, no estado da Paraíba. Posteriormente, *M. agalactiae* foi descrito em outros estudos também na Paraíba (DE AZEVEDO et al., 2006; BANDEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2014), em Pernambuco (ALVES et al., 2013) e Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2014). Recentemente, *M. agalactiae* foi descrito pela primeira vez na Bahia em amostras de *swab* nasal de cabras por PCR (CASTILHO JUNIOR et al., 2021).

M. agalactiae pode atingir pulmões, nódulos linfáticos, olhos, glândulas mamárias e articulações promovendo vários sinais clínicos em ovinos e caprinos. Embora as lesões pulmonares por esta espécie sejam pouco observadas, o micro-organismo foi isolado em surto de pleurisia em cabras. As infecções podem levar à ceratoconjuntivite, diminuição ou supressão da produção de leite, artrite, ancilose, abortos ou natimortos, vulvovaginite granular e inflamação testicular (KUMAR et al., 2014). Portadores assintomáticos da doença em caprinos 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 (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; GLEW et al., 2000; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

No Brasil, não há vacinas comerciais e regulamentação para a prevenção da AC. A vacinação é recomendada para regiões endêmicas e em áreas com baixo padrão social e econômico. Nesses países o desenvolvimento de vacinas de nova geração contra AC é necessário (MADANAT, ZENDULKOVÁ, POSPÍŠIL, 2001).

Apesar de micoplasmas 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. Assim, as interações entre estes micro-organismos e o hospedeiro são resultado de algumas propriedades da membrana citoplasmática (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999). As proteínas integrais e associadas a membrana estão expostas ao ambiente e influenciam a sobrevivência e patogênese do micro-organismo. Estas proteínas são antigênicas e podem proporcionar novos alvos para o desenvolvimento de vacinas e terapia (CACCIOTTO et al., 2010). Neste contexto, diversas proteínas são estudadas e sugeridas ou como possíveis alvos na prevenção e controle de

infecções por micoplasmas, ou por possuírem função na imunopatologia da micoplasmose. Em *M. agalactiae*, poucos antígenos de membrana foram identificados como imunogênicos e estão sendo estudados como potenciais alvos para o controle da AC, como a proteína P30 (FLEURY et al., 2001), a citoadesina P40, (FLEURY et al., 2002), a proteína P48 (ROSATI et al., 1999; CHESSA et al., 2009) e a lipoproteína MAG_5040 (CACCIOTTO et al., 2013). Além dessas, as proteínas de membrana MAG_1560 e MAG_6130 também foram identificadas como possivelmente antigênicas por meio de análises de bioinformática e demonstraram reatividade, em ELISA e *Western blotting*, à soros de caprinos infectados (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020). Contudo, a função de apenas algumas proteínas de *M. agalactiae* tem sido descritas e o impacto na patogenicidade e virulência avaliados. A primeira proteína com função descrita em *M. agalactiae* foi a proteína de membrana P40, a qual demonstrou possuir função na adesão entre essa bactéria e células sinoviais da articulação de carneiros (FLEURY et al., 2002). A primeira molécula envolvida na invasão de *M. agalactiae* à célula eucariótica (HeLa) foi a subunidade B da piruvato desidrogenase (HEGDE; ROSENGARTEN; CHOPRA-DEWASTHALY, 2015). As proteínas mais amplamente descritas e estudadas em *M. agalactiae* são pertencentes a família de proteínas Vpma, importantes lipoproteínas de alta frequência de variação antigênica (FLITMAN-TENE et al., 2000; GLEW et al., 2000b), com função de adesinas e invasinas em células HeLa e células estromais e epiteliais da glândula mamária de ovelhas (HEGDE et al., 2018).

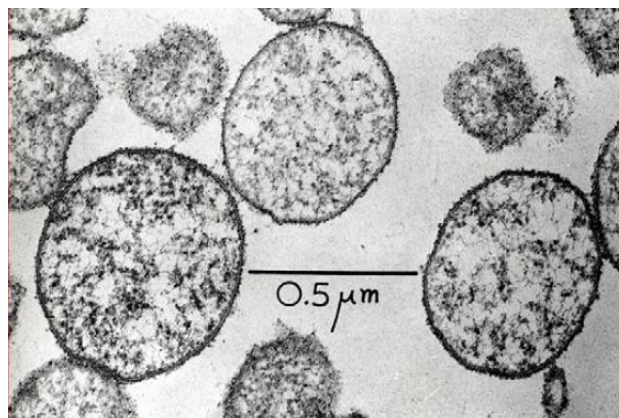
Nesse contexto, o entendimento da função das proteínas de membrana de *M. agalactiae* auxiliaria na caracterização de novos fatores de virulência e seu papel no estabelecimento da infecção em pequenos ruminantes. Desta forma, conhecer as lipoproteínas e seu papel no desencadeamento da imunopatogênese tem relevância para futuros estudos de diagnóstico, tratamento, prevenção e erradicação das doenças causadas por *M. agalactiae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características biológicas do gênero *Mycoplasma*

Bactérias do gênero *Mycoplasma* são os menores micro-organismos autorreplicantes e ao contrário das bactérias típicas, não possuem parede celular, sendo delimitados apenas pela membrana celular (Figura 01). Estas características, em geral, definem como bactérias pertencentes a Classe dos *Mollicutes* (van ITERSON; RUYS, 1960). 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 pleomórficos com 300-800 nm de diâmetro, podendo transpor filtros de 450 nm e possuem crescimento ideal a 37 °C (BERGEY, 2010). Dependendo da espécie, podem fermentar glicose ou hidrolisar arginina, ou usar as duas vias metabólicas como principal fonte de energia; e para a síntese da membrana celular, micoplasmas incorporam colesterol ou esteróis do ambiente (BERGEY, 2010). Em meio sólido, se observadas em estereomicroscópio, possuem colônias típicas em formato de ovo frito, e em caldo, pelo pequeno tamanho, não turvam o meio de cultura líquido, ao contrário da maioria das bactérias (DAHL, 1983; BROWN et al., 2018).

Figura 01 - Micrografia eletrônica de micoplasmas



Legenda: Células de micoplasmas envoltas pela membrana celular. No citoplasma, estão representados o cromossomo seccionado e os grânulos escuros representando ribossomos.

Fonte: RAZIN; HAYFLICK, 2010.

Micoplasmas possuem genoma reduzido (entre 580 Kbp e 1350 Kbp), quando comparado com outras bactérias como *Escherichia coli* (em média 5130 Kpb), baixo conteúdo GC (23-40%) e usam o códon UGA como codificador de triptofano. Considera-se que micoplasmas evoluíram das bactérias gram-positivas por evolução redutiva ou degenerativa (WOESE, 1987; RAZIN; YOGEV; NAOT,

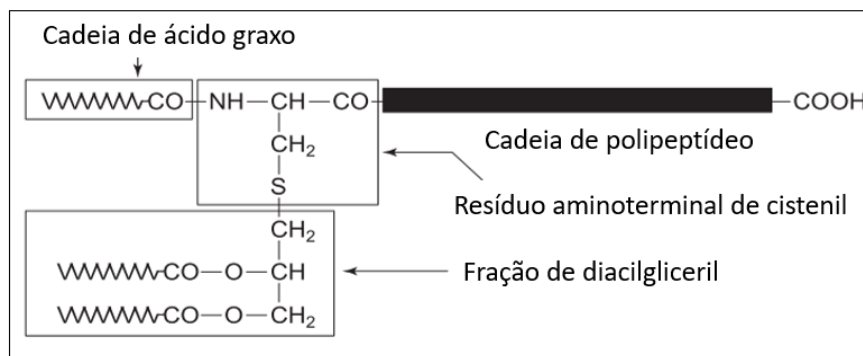
1998). Por possuírem genoma reduzido, apresentam vias metabólicas incompletas, como a do ciclo do ácido tricarboxílico (tornando-os nutricionalmente exigentes), são de cultivo demorado e dependentes do hospedeiro para obtenção de energia e precursores biosintéticos (TULLY, 1995; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; YUS et al., 2009). Entretanto, apesar de aparente simplicidade, micoplasmas possuem respostas metabólicas e adaptação similar em comparação com bactérias mais complexas (YUS et al., 2009).

Micoplasmas são comensais ou patogênicos e colonizam diversos hospedeiros vertebrados. Em humanos e animais colonizam principalmente mucosas do trato respiratório, urogenital, gástrico, olhos, glândulas mamárias e articulações (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Geralmente possuem especificidade à hospedeiros e tecidos, embora exceções possam ocorrer, como relatado com *M. pneumoniae*, agente infeccioso do sistema respiratório inferior em humanos mas isolado também em amostras urogenitais (GOULET et al., 1995). Também têm sido descrito novas espécies de micoplasmas em animais selvagens ou espécies que colonizam hospedeiros próximos (VERBISCK-BUCKER et al., 2008; TARDY et al., 2012; CITTI; BLANCHARD, 2013). São comuns contaminantes de imunobiológicos, culturas celulares e de tecidos (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Apesar de possuírem genoma mínimo, micoplasmas são bactérias complexas e possuem diversos fatores de virulência e mecanismos de evasão do sistema imune. Proteínas de membrana presentes na superfície de micoplasmas possuem uma importante função na sobrevivência desses micro-organismos pois são bactérias primariamente extracelulares, e por não possuírem parede celular, essas moléculas estão em contato direto com células do hospedeiro ou ambiente (ROTTEM, 2003). Várias moléculas de superfície em micoplasmas estão envolvidas com: mecanismos de variação fenotípica, com variação antigênica e unidades repetitivas que fornecem variação no tamanho proteico, aderência e/ou invasão às células hospedeiras, evasão do sistema imune e divisão celular, como VihA (também denominada pMGA) em *M. gallisepticum* (GLEW et al., 2000a; MAY; BROWN, 2011; HU et al., 2016), Vpma (também denominada Avg) em *M. agalactiae* (FLITMAN-TENE et al., 1997, 2000; GLEW et al., 2000b; HEGDE et al., 2018), Vsp em *M. bovis* (FLITMAN-TENE et al., 1997), Vlp em *M. hyorhinis* (CITTI et al., 2000; XIONG et al., 2016a, 2016b), Vmc em *M. capricolum* subsp *capricolum* (WISE et al., 2006), Vsa em *M. pulmonis* (GUMULAK-SMITH et al., 2001; SIMMONS; DYBVIG, 2003; BOLLAND; DYBVIG, 2012), Mpl em *M. penetrans* (HORINO et al., 2003, 2009), MBA em *Ureaplasma parvum* e *U. urealyticum* (MONECKE; HELBIG; JACOBS, 2003; DANDO et al., 2012; ROBINSON et al., 2013a; UCHIDA et al., 2013; SWEENEY et al., 2017) e MBA-like em *U. diversum* (MARQUES et al., 2016).

Micoplasmas possuem, na membrana plasmática, diversas lipoproteínas (20 – 30% de todas as ORFs) denominadas proteínas de membrana associadas a lipídios (LAMPs) as quais estão em contato direto com o ambiente ou com a célula hospedeira. As LAMPs são proteínas periféricas ligadas à membrana principalmente por interações eletrostáticas e podem ser extraídas pelo Triton X-114 devido suas características hidrofóbicas. A estrutura das LAMPs consiste em dois ácidos graxos esterificados ligados à gliceril cisteína ancorados na membrana pela porção N-terminal lipídica (Figura 02). O grupo amino da cisteína pode ser diacilado, triacilado ou não acilado (maioria dos micoplasmas), diferindo de bactérias Gram-positivas e negativas que possuem lipoproteínas triaciladas. As lipoproteínas diaciladas, em micoplasmas, estimulam mais o sistema imune do hospedeiro do que as lipoproteínas triaciladas. Tem sido sugerido que as lipoproteínas, em micoplasmas, possuem as mesmas funções que proteínas periplasmáticas em bactérias gram-negativas, como transporte, além de estarem relacionadas também à variação antigênica, adesão às células hospedeiras, e estimulação do sistema imune (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; YOU; ZENG; WU, 2006; BROWNING et al., 2011).

Figura 02 - Estrutura química de lipoproteínas



Legenda: Estrutura química de lipoproteínas ancoradas na membrana bacteriana. A lipoilação do resíduo cisteínico amino terminal por um diacilgliceril via uma ligação tioéster é uma característica comum a todas as lipoproteínas de membrana bacteriana conhecidas. Algumas lipoproteínas possuem uma terceira cadeia de acil no grupo amino do resíduo cisteínico.

Fonte: CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999 (Adaptado).

Micoplasmas podem colonizar ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos), sendo alguns patogênicos e outros oportunistas, podendo ocasionar sintomas ou não (CHAZEL et al., 2010). Dentre as síndromes associadas a micoplasmas patogênicos destacam-se: a Agalaxia contagiosa (AC), causada principalmente por *M. agalactiae*; Pneumonia não progressiva ovina, causada por *M. ovipneumoniae*; Pleuropneumonia contagiosa caprina, causada por *M. capricolum* subsp.

capripneumoniae; e Pleuropneumonia contagiosa bovina, causada por *M. mycoides* subsp. *mycoides* (RUFFIN, 2001). Dentre essas síndromes, a Organização Mundial da Saúde Animal, conhecida pela sigla OIE (*Office International des Epizooties*), classifica três micoplasmoses como notificação obrigatória por possuírem importante impacto econômico devido à alta morbidade e mortalidade: a Pleuropneumonia contagiosa bovina; a Pleuropneumonia contagiosa caprina e a AC. Outros micoplasmas que também colonizam ruminantes são: *M. arginini*, relacionado à infecções respiratórias, embora não é considerado um agente primário; *M. mycoides* subsp *capri*, relacionado com pleuropneumonia e artrite; *M. mycoides* subsp *capricolum*, associado à artrite e mastite (RUFFIN, 2001); e *M. bovis* associado à mastite e infecções respiratórias (PFÜTZNER; SACHSE, 1996).

2.2 Mecanismos de virulência e patogenicidade em micoplasmas

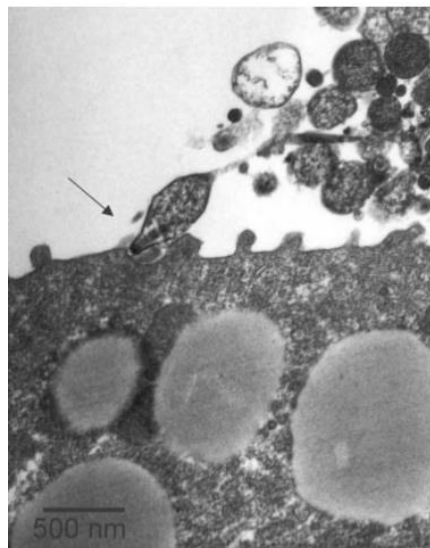
2.2.1 Adesão à célula hospedeira

Adesão ao hospedeiro é uma etapa fundamental para colonização microbiana e infecção. Essa adesão é mediada geralmente por moléculas que estão ancoradas na superfície do micro-organismo e pode ocorrer por diversas maneiras (VENGADESAN; NARAYANA, 2011; COZENS; READ, 2012). Inicialmente, a bactéria usa moléculas hidrofóbicas para permitir uma adesão fraca e inespecífica. Após proximidade com a célula, a bactéria pode realizar ligações mais fortes com a superfície por meio de proteínas ou polissacarídeos. Outra forma de adesão específica é por meio de interações proteína-proteína, envolvendo adesinas e componentes da matriz extracelular. Há também adesinas que não são proteínas ou polissacarídeos (COZENS; READ, 2012). A adesão bacteriana pode alterar a sinalização celular, permitindo a disseminação do patógeno, evasão das respostas imunes do hospedeiro, internalização ou formação de biofilme (COZENS; READ, 2012; STONES; KRACHLER, 2015). A citoaderência é a etapa inicial no processo de virulência de micoplasmas patogênicos e precede várias respostas das células do hospedeiro, como a indução de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo (BASEMAN; TULLY, 1997).

No sistema de adesão “*attaching and effacing*” em *E. coli*, a bactéria atua aumentando o acúmulo de proteínas do citoesqueleto do hospedeiro, formando microvilosidades absorptivas nas quais as bactérias se aderem. São ativadas proteínas efetoras do sistema de secreção do tipo III (Tir - receptor translocado da intimina) que é inserido nas células-alvo do hospedeiro e funciona como um receptor para outra molécula, LEE (uma intimina). Proteínas relacionadas à actina são recrutadas e auxiliam na formação de estruturas semelhantes a pedestais nas quais as bactérias se aderem (SOLANKI; TIWARI;

TIWARI, 2018). Micoplasmas, incluindo espécies com motilidade específica do tipo *gliding*, não possuem estruturas típicas de adesão homólogas ao pili ou fimbrias (RAZIN; HERRMANN, 2002) e apresentam vias menos complexas de sistemas de secreção (ausência de YajC, SecB e, em algumas espécies, ausência de SecDF, SecE e SecG) (STAATS et al., 2007). As adesinas melhor caracterizadas em micoplasmas são as de micoplasmas de importância humana, *M. pneumoniae* (causador de pneumonia atípica) e *M. genitalium* (associado à infecções sexualmente transmissíveis), e as adesinas de *M. gallisepticum* (responsável por infecções aviárias), em micoplasmas animais. Esses micro-organismos possuem uma organela de adesão (*bleb*) como mostrado na Figura 03, exemplificado pelo *M. pneumoniae*. Esta estrutura é terminal na célula e possui um filamento central com várias adesinas (proteínas interativas e acessórias) (WAITES; TALKINGTON, 2004). As proteínas acessórias à adesão interagem com moléculas do citoesqueleto para facilitar o movimento lateral e concentrar as adesinas na porção terminal do micro-organismo (WAITES; TALKINGTON, 2004).

Figura 03 - Micrografia eletrônica da "organela de adesão" em *Mycoplasma pneumoniae*

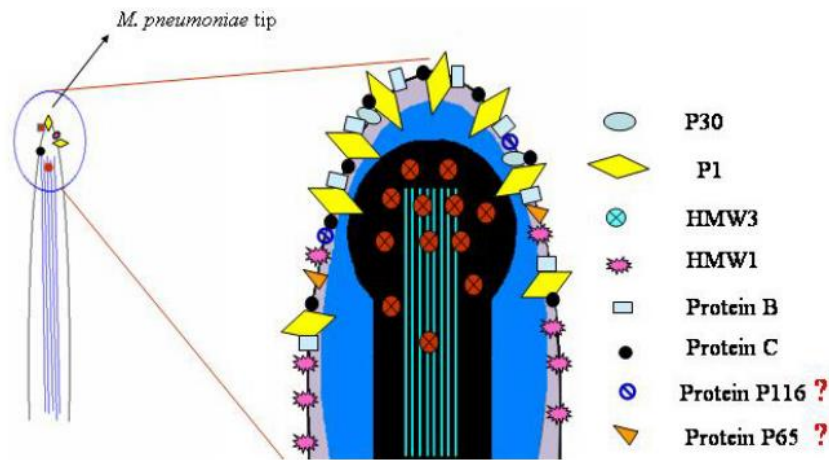


Legenda: Micrografia eletrônica de transmissão do anel traqueal de hamster infectado por *Mycoplasma pneumoniae*. A seta indica a "organela de adesão" em associação próxima ao epitélio.

Fonte: WAITES; TALKINGTON, 2004.

Em *M. pneumoniae* várias proteínas (HMW-1, HMW-2, HMW-3, P90, P40, P65 e P30, P116) são necessárias na formação do *bleb* (Figura 04). Após sua formação inicial outras proteínas são recrutadas (proteínas B, C e P1) para o *bleb* funcional. Dentre estas, as proteínas P1 e P30 estão diretamente envolvidas no receptor de ligação e as proteínas acessórias HMW, A, B e C não são adesinas mas são necessárias para a função do *bleb* (ROTTEM, 2003; BALISH, 2006; CHAUDHRY; VARSHNEY; MALHOTRA, 2007).

Figura 04 - Proteínas de adesão de *Mycoplasma pneumoniae*



Legenda: Representação esquemática de proteínas de adesão e acessórias de *M. pneumoniae*.
Fonte: CHAUDHRY; VARSHNEY; MALHOTRA, 2007.

Outros micoplasmas não possuem uma estrutura específica para adesão e ainda assim possuem citoaderência mediada por lipoproteínas, como: Lpps (proteínas de membrana rica em serina) em *M. conjunctivae* (BELLOY et al., 2003), Vaa (adesina variável associada à aderência) em *M. hominis* (BOESEN et al., 2001), P40 (FLEURY et al., 2002) e Vpmas (HEGDE et al., 2018) em *M. agalactiae*, e TrmFO em *M. bovis* (GUO et al., 2017).

Micoplasmas ligam-se às membranas das células hospedeiras, principalmente pelos receptores sialoglicoconjugados ou glicolipídeos sulfatados. Mais de um tipo de receptores podem também estar envolvidos na adesão de uma mesma espécie bacteriana (ROTTEM, 2003). A ligação entre receptores-adesinas tem sido demonstrada em diversas espécies, por exemplo: *M. pneumoniae* (WILLIAMS et al., 2018), *M. genitalium* (APARICIO et al., 2018), em *M. mobile*, em peixes (HAMAGUCHI et al., 2019) e em *M. synoviae*, em aves (MAY; DUNNE; BROWN, 2014).

O desenvolvimento de agentes terapêuticos baseadas em adesinas bacterianas é uma alternativa à resistência bacteriana à antibióticos. Uma das estratégias baseadas na inibição da adesão bacteriana é o uso de receptores análogos para inibir a adesão. Nesse caso, ocorre inibição competitiva com receptores do hospedeiro para interações com adesinas bacterianas, contudo, requer múltiplos inibidores para prevenir a adesão. Análogos de adesinas também inibem a adesão por competição, contudo efeitos tóxicos e colaterais podem ser observados devido ao mimetismo molecular, além disso, grandes quantidades da molécula são necessárias. Adicionalmente, pode-se também afetar a adesão bacteriana ao inibir a biossíntese de adesinas (KLEMM; VEJBORG; HANCOCK, 2010; COZENS; READ, 2012). A prevenção da infecção bacteriana baseada no estímulo

à produção de anticorpos anti-adesinas podem evitar/ diminuir a adesão e a colonização dos micro-organismos (SOLANKI; TIWARI; TIWARI, 2018). A construção/ seleção de antígenos multiepítotos podem solucionar problemas associados com a variabilidade antigênica de algumas proteínas (SOLANKI; TIWARI; TIWARI, 2018).

Diversas estratégias vacinais têm sido estudadas utilizando adesinas bacterianas como alvo vacinal. Nesse contexto, destaca-se estudos relacionados à adesinas de *E. coli*, como as adesinas: CfaE, CsbD e CotD usadas em uma estratégia de multiepítotos para abranger a variabilidade da sequência proteica de fímbrias de estirpes enterotoxigênicas (LIU et al., 2020a), apenas a adesina CfaE (antígenos do fator de colonização I) (SINCOCK et al., 2016; ROLLENHAGEN et al., 2019), FaeG (LU; MOXLEY; ZHANG, 2019), multiepítotos de CFA do tipo I, II e IV (NANDRE et al., 2018), CFA do tipo I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS21 e EtpA (NANDRE et al., 2016). Algumas dessas estratégias foram capazes de induzir respostas de anticorpos, incluso em primatas não humanos (NANDRE et al., 2016), ou inibiram a aderência bacteriana *in vitro* (NANDRE et al., 2018).

Estudos utilizando adesinas de *Streptococcus pneumoniae* glicoconjugadas tem demonstrado resultados mais promissores. Duas proteínas recombinantes multiepítotos (YAPO e YAPL) com sequências antigênicas de pneumolisina (Ply), proteína A de superfície pneumocócica (PspA) e adesina A de superfície pneumocócica (PsaA) demonstraram indução de resposta imune dependente de células T eficaz contra vários sorotipos de *S. pneumoniae* em camundongos (FENG et al., 2020). Estratégias variadas com epítotos da adesina PsaA glicoconjugados também tem sido estudados e demonstraram capazes de induzir resposta imune humoral em camundongos (PILLOT et al., 2019; PRASANNA et al., 2019).

2.2.2 Proteínas de ligação à Matriz Extracelular

Adesinas bacterianas aderem à matriz extracelular (MEC) do hospedeiro composta por proteínas e polissacarídeos. No contato, a produção de agentes inflamatórios ativa os fibroblastos do estroma induzindo-os a secretar os componentes da MEC, com função estrutural e de adesão. Os componentes da MEC incluem colágeno, elastinas, fibronectina, fatores de crescimento e laminina e são alvos preferenciais para adesão bacteriana (PATEL; MATHIVANAN; GOYAL, 2017). A MEC pode ser dividida em matriz intersticial e membrana basal. Em geral, a matriz intersticial é constituída principalmente de colágeno e fibronectina e a membrana basal, constituída de colágeno tipo IV e laminina, formando uma estrutura mais compacta da MEC que interage diretamente com células endoteliais (Figura 05) (BOYD; THOMAS, 2017).

A Fibronectina é uma glicoproteína heterodimérica de multi domínio com a função principal de conectar a célula à MEC. A fibronectina se liga à heparina (com baixa afinidade) e fibrina (com alta afinidade). A interação fibronectina-fibrina é importante para a adesão do estroma celular, migração celular em coágulos de fibrina e para a remoção de macrófagos da circulação após inflamação. A fibronectina também se liga ao colágeno (auxiliando na adesão celular) e à integrinas (permite a ligação da MEC com o citoesqueleto intracelular) (VACA et al., 2020). As proteínas de ligação à fibronectina constituem um grupo diverso de adesinas de superfície em bactérias. Em *Staphylococcus aureus*, esta interação com a fibronectina facilita a ligação bacteriana à superfície da célula hospedeira via integrina auxiliando a adesão, invasão e formação de biofilme bacteriano (STONES; KRACHLER, 2015).

O fibrinogênio é uma proteína hexamérica composta de duas cópias de três cadeias peptídicas: A α , B β e γ , secretada por hepatócitos e convertido em fibrina, a qual atua na etapa final da coagulação (STANDEVEN; ARIËNS; GRANT, 2005). O fibrinogênio também atua como defesa inicial do hospedeiro na infecção por bactérias, limitando fisicamente ou isolando focos bacterianos no tecido infectado, recrutando e ativando células imunes inibindo o crescimento e a disseminação microbiana (KO; FLICK, 2016). Por outro lado, as proteínas bacterianas de superfície que se ligam ao plasminogênio propiciam a agregação bacteriana e formação de biofilme, e promovem resistência à fagocitose de neutrófilos (PICKERING et al., 2019).

As lamininas são os principais constituintes das membranas basais e são as primeiras proteínas da MEC a serem produzidas durante a embriogênese. Possuem interações específicas com o colágeno tipo IV, proteoglicanos e outros componentes da MEC possuindo papel funcional e estrutural. As lamininas são moléculas heterotriméricas e têm aparência plana e em forma de cruz característica, compostas por três cadeias, α , β e γ , ligadas entre si por pontes dissulfeto (HAMMERSCHMIDT; ROHDE; PREISSNER, 2014).

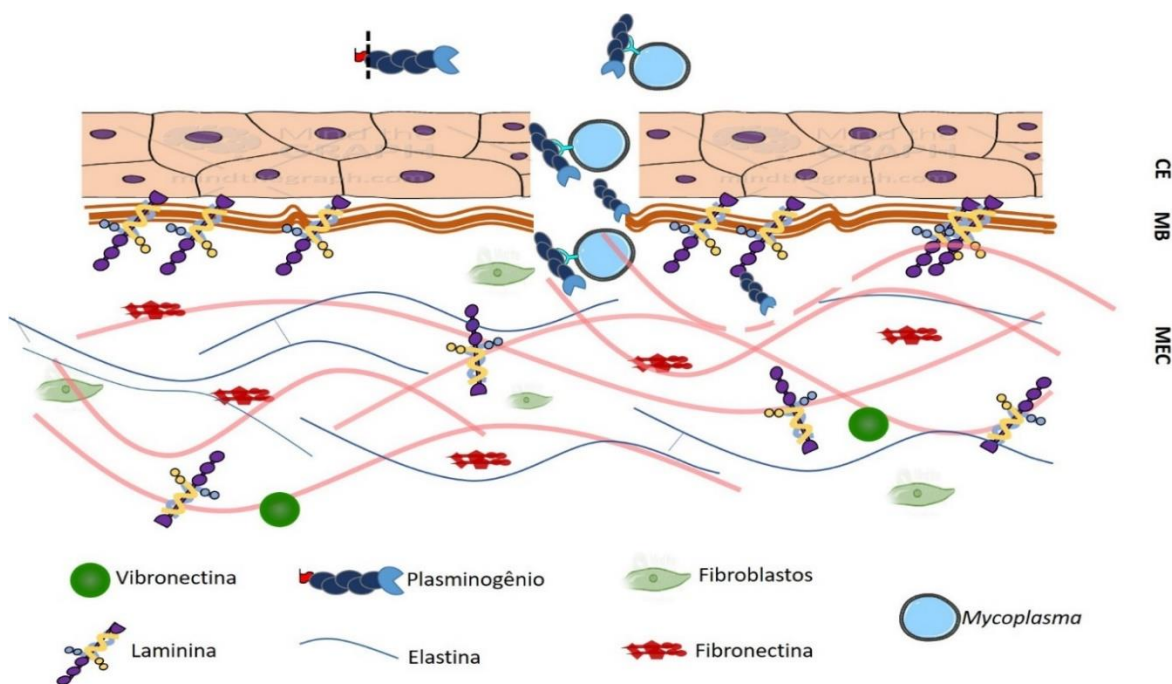
2.2.3 Proteínas de ligação a outras moléculas do hospedeiro

O plasminogênio é sintetizado no fígado e liberado na circulação sanguínea como um zimogênio. É convertido em plasmina pelos ativadores de plasminogênio tecidual (tPA - *tissue-type plasminogen activator*) e pela uroquinase (uPA - *urokinase-type plasminogen activator*). A principal função da plasmina é degradar a fibrina (fibrinólise), atuando na coagulação do sangue, migração celular e no reparo de tecidos. A plasmina também ativa a pró-colagenase em colagenase que, por sua vez, degrada colágeno, fibronectina, laminina e ativa mediadores do complemento. O plasminogênio é regulado pelo inibidor do ativador de plasminogênio 1 e 2 (PAI), α 2-antiplasmina e α 2-macroglobulina.

PAI-1 é regulado pela vitronectina, inibindo a atividade do plasminogênio ao inativar tPA e uPA. Dessa forma, na infecção ocorre aumento da produção de plasmina acelerando o dano tecidual beneficiando a invasão do patógeno no tecido do hospedeiro. A bactéria recruta plasminogênio à sua superfície, o qual será clivado em plasmina, que por sua vez, degrada proteínas da MEC (Figura 05) (SINGH et al., 2012; HAMMERSCHMIDT; ROHDE; PREISSNER, 2014).

A lactoferrina é uma proteína relacionada à vários efeitos protetores em mamíferos, possui alta afinidade pelo ferro em locais de inflamação sendo a proteína dominante de ligação ao ferro em mucosas. É encontrada no leite na maioria das espécies, e em humanos é a glicoproteína mais abundante no leite. É secretada pelas células epiteliais, liberada dos grânulos secretores de neutrófilos na inflamação e ao ser clivada, libera um peptídeo antimicrobiano, lactoferricina, o qual causa depleção de ferro e /ou ruptura da membrana bacteriana. Alguns patógenos possuem receptores à lactoferrina para aquisição de ferro para o crescimento e proteção contra peptídeos antimicrobianos catiônicos (BARBOZA et al., 2012; MORGENTHAU et al., 2013).

Figura 05 - Interações entre plasminogênio, matriz extracelular e patógenos



Legenda: Plasminogênio é recrutado pela superfície bacteriana e convertido em plasmina, a qual degrada a membrana basal, laminina e fibronectina. Esse processo permite às bactérias maior adesão e invasão aos tecidos do hospedeiro. CE: células epiteliais, MB: membrana basal e MEC: matriz extracelular.

Fonte. Adpatado de SINGH et al., 2012.

Em micoplasmoses as proteínas da superfície bacteriana que se ligam a moléculas do hospedeiro são pouco conhecidas e estão descritas na tabela a seguir (tabela 01).

Tabela 01 - Proteínas em espécies de micoplasmas que possuem interações com componentes da matriz extracelular (MEC)

(continua)			
<i>Mycoplasma sp.</i>	Adesina	Molécula da MEC	Referência
<i>M. bovis</i>	NADH oxidase	Fibronectina	(ZHAO et al., 2017)
	TrmFO	Fibronectina	(GUO et al., 2017)
	Frutose-1,6-bifosfato aldolase	Fibronectina	(GAO et al., 2018;
	P27	Plasminogênio	HUANG et al., 2019)
		Fibronectina	(CHEN et al., 2018)
<i>M. synoviae</i>	MsEno	Plasminogênio	(BAO et al., 2014)
<i>M. pneumoniae</i>	Fator de alongação Tu	Fibronectina	(BALASUBRAMANIAN; KANNAN; BASEMAN, 2008)
	GAPDH	Plasminogênio	(DUMKE;
		Fibrinogênio	HAUSNER;
		Fibronectina	JACOBS, 2011;
		Vitronectina	GRIMMER;
			DUMKE, 2019)
	GroEL	Plasminogênio	(HAGEMANN et al.,
	DnaK	Vitronectina	2017)
		Fibronectina	
		Fibrinogênio	
		Lactoferrina	
		Laminina	
	Pdh	Fibrinogênio	(GRÜNDEL et al.,
	GapA	Vitronectina	2016b)
	Ldh	Laminina	
Pgm	Plasminogênio		
Pyk			
Tkt			
Pdh	Lactoferrina	(GRÜNDEL et al.,	
GapA		2016b)	
Pyk			
Pdh	Fibronectina	(GRÜNDEL et al.,	
GapA		2016b)	
<i>M. gallisepticum</i>	PlpA	Fibronectina	(MAY et al., 2006)
	PDHA	Plasminogênio	(QI et al., 2006)
	PDHB		
	MGE _{Eno}		

Tabela 01 - Proteínas em espécies de micoplasmas que possuem interações com componentes da matriz extracelular (MEC)

<i>Mycoplasma sp.</i>	Adesina	Molécula da MEC	Referência
<i>M. hyopneumoniae</i>	Frutose-1,6-bifosfato aldolase	Fibronectina	(YU et al., 2018a)
	P116	Fibronectina	(SEYMOUR et al., 2010)
	Fator de alongação Tu	Fibronectina	(YU et al., 2018b)
	P102	Fibronectina	(SEYMOUR et al., 2012)
	P60	Plasminogênio	
	P42		
	Mhp271	Fibronectina	(DEUTSCHER et al., 2010)
	MhpEno	Plasminogênio	(CHEN et al., 2019)
	P97	Plasminogênio	(ROBINSON et al., 2013b; JAROCKI et al., 2015)
	P102		
	MHJ_0125		
	MHJ_0461		
	P146	Plasminogênio	(BOGEMA et al., 2012)
Mhp107	Plasminogênio	(SEYMOUR et al., 2011)	
	Fibronectina	(MAY et al., 2006)	
	Fibronectina	(MAY et al., 2006)	
	Plasminogênio	(QI et al., 2018)	
	Plasminogênio	(CHEN et al., 2011)	

2.2.4 Mecanismos de evasão do sistema imune em micoplasmas

A adesão à célula hospedeira é fundamental na colonização, contudo, apenas a adesão não é suficiente para estabelecer e manter a infecção (STONES; KRACHLER, 2015). Além da adesão, micoplasmas possuem outras propriedades biológicas importantes na virulência, como a geração de peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos, os quais induzem o estresse oxidativo; competição e depleção de nutrientes ou precursores biossintéticos; presença de cápsula; variação antigênica de fase e de alta frequência; secreção de enzimas; e invasão intracelular (BASEMAN; TULLY, 1997).

Em micoplasmas, três processos principais modulam a superfície do micoplasma e a estrutura antigênica: (1) alta frequência de ativação/ desativação de genes, resultando em diferenças na expressão de proteínas de superfície (variação de fase); (2) variação no comprimento da cadeia peptídica da lipoproteína (variação de tamanho, com repetições *in tandem*) e (3) mimetismo de regiões da lipoproteína (ROTTEM; NAOT, 1998). A ativação/

desativação de genes é responsável pelas principais alterações antigênicas que ocorrem em alta frequência nas populações clonais de micoplasma. Dois tipos de ativação/ desativação de genes que alteram a expressão foram descritos e são baseados em inserção/ deleção de nucleotídeos, ou em recombinação de DNA com recombinase específica. O primeiro sistema consiste em um agrupamento de genes que codificam várias lipoproteínas relacionadas. Cada gene representa uma única unidade de transcrição. A inserção ou deleção de um único nucleotídeo na região promotora é suficiente para evitar a transcrição independentemente para cada gene e resulta na célula expressando um único produto ou uma combinação de qualquer produto de determinada lipoproteína. O segundo mecanismo associado com variação de fase em micoplasmas é baseado em rearranjos de DNA com uma recombinase específica, silenciando um gene enquanto outros são expressos (CITTI; NOUVEL; BARANOWSKI, 2010). O mimetismo molecular, por sua vez, permite que epítomos antigênicos sejam semelhantes em diferentes micoplasmas e células hospedeiras promovendo não apenas a evasão do sistema imune, mas também, a indução de autoanticorpos (ROTTEM; NAOT, 1998). Esses mecanismos de variação antigênica das lipoproteínas de superfície modulam as interações do micoplasma com o ambiente do hospedeiro, como a ligação do anticorpo às lipoproteínas (CITTI; NOUVEL; BARANOWSKI, 2010).

Alguns micoplasmas, além de aderir às células, possuem também mecanismos para entrar em células eucarióticas não fagocíticas, como *M. gallisepticum* (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000), *M. hyorinis* (KORNSPAN; TARSHIS; ROTTEM, 2010), *M. genitallium* (UENO et al., 2008), *M. synoviae* (DUŠANIĆ et al., 2009), *M. suis* (GROEBEL et al., 2009), *M. bovis* (BÜRKI et al., 2015) e *U. diversum* (MARQUES et al., 2009, 2010; AMORIM et al., 2014). Micoplasmas intracelulares estão protegidos da resposta imune humoral e da ação de muitos antibióticos. Quando estão dentro da célula podem se localizar no citoplasma na região perinuclear, como demonstrado em infecções de Hep-2 por *U. diversum*, por exemplo (MARQUES et al., 2010). A invasão está associada às adesinas e receptores da célula hospedeira. Em geral, a invasão é baseada na capacidade de várias bactérias de se ligar à fibronectina ou polissacarídeos sulfatados (ROTTEM, 2003).

2.3 *Mycoplasma agalactiae* e agalaxia contagiosa (AC)

Agalaxia contagiosa (AC) foi descrita clinicamente pela primeira vez em 1816 na Itália, contudo foi apenas em 1871 que a doença foi chamada de Agalaxia contagiosa. *M. agalactiae*,

o principal agente causador da AC em caprinos e ovinos (responsável por mais de 80% das infecções), foi isolado e cultivado pela primeira vez por Bridre e Donatien, em 1923. Em 1931, Wroblewski denominou o patógeno de *Anulomyces agalaxie* e apenas em 1957, após mudanças na taxonomia de micoplasmas, o pesquisador Freundt chamou o agente de *M. agalactiae* (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001; KUMAR et al., 2014). *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* também são agentes causadores da AC em pequenos ruminantes (ASSUNCAO et al., 2006; BARANOWSKI et al., 2010; BECKER et al., 2012; CHAZEL et al., 2010, NICHOLAS, AYLING, LORIA, 2008). *M. putrefaciens* também pode causar AC (CHAZEL et al., 2010; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013), ou, segundo outros autores, causa uma doença com manifestações clínicas e patológicas similares (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001; KUMAR et al., 2014). Co-infecções de espécies de micoplasmas foram descritas (AMORES et al., 2011; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013).

A AC é uma doença com alta morbidade e mortalidade. Até 60% de um rebanho infectado pode possuir sinais clínicos e a mortalidade de animais jovens pode ser de até 70%. A doença causa, principalmente, redução ou ausência da produção de leite e abortos. Devido os custos com diagnóstico, tratamento e prevenção a AC é considerada um importante problema de saúde pública veterinário. As perdas estimadas atingem cerca 30 milhões de dólares por ano em países europeus, principalmente em países com produção intensiva de ovelhas e cabras (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001; NICHOLAS, 2002). Foi relatada perda de mais de 100 000 € para controle da doença, em uma única fazenda na Itália, indicando que as perdas financeiras relacionadas a essa doença são altas e subestimadas (LORIA et al., 2019).

M. agalactiae é imóvel, possui morfologia cocóide e diâmetro entre 124-250 nm. Cresce em meio SP4 ou Hayflick à 37 °C, pH 7,6. Possui vias metabólicas incompletas, portanto necessita de meio de cultivo suplementado com glicose ou piruvato, como fontes de energia; soro animal, para fornecimento de esterol, essencial para a síntese da membrana plasmática; extrato de levedura e aminoácidos como fonte de precursores de compostos nitrogenados para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Em meio sólido, produz colônias de aparência típica de “ovo frito”, e forma "películas e manchas" (composta de colesterol, fosfolipídios e sais de ácidos graxos) devido a reação ao soro animal (BERGEY, 2010).

A Agalaxia contagiosa, assim como a pleuropneumonia contagiosa bovina, causada pelo *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, e pleuropneumonia contagiosa caprina, causada pelo *Mycoplasma capricolum* subspécie *capripneumoniae* são classificadas pela *World Organization for Animal Health* (OIE) como doenças de notificação obrigatória, pelo impacto

econômico significativo na pecuária (OIE, 2019). Agalaxia contagiosa acomete pequenos ruminantes no mundo, principalmente em países asiáticos, subdesenvolvidos e países do Mar Mediterrâneo (KUMAR et al., 2014; OIE, 2018). Em áreas endêmicas, como na Espanha, *M. agalactiae*, foi isolado em 40% do rebanho com 66% de prevalência sorológica (DE LA FE et al., 2005) e frequência de aproximadamente 11% em animais selvagens (VERBISCK-BUCKER et al., 2008; CHAZEL et al., 2010; VERBISCK et al., 2010) demonstrando não apenas alta frequência, mas também, ampla distribuição (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012). A presença de isolados atípicos de *M. agalactiae* em animais selvagens também tem sido relatado (TARDY et al., 2012). Além disso, *M. agalactiae* foi detectado em 88% dos centros de inseminação analisados, demonstrando a presença do micro-organismo em animais portadores assintomáticos em programas reprodutivos (AMORES et al., 2011). Tipagens moleculares em amostras espanholas (n=410) mostraram alta homogeneidade genômica caracterizando a circulação de uma única população clonal endêmica (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2013). Entretanto, estudos prévios de tipagem molecular indicaram que isolados espanhóis de uma área endêmica possuíam diferentes isolados clonais (DE LA FE et al., 2012).

No Brasil, a presença de micoplasmas em pequenos ruminantes é subnotificada, especificamente, existem poucos estudos de prevalência de *M. agalactiae* em rebanhos caprinos e ovinos nacionais. Em São Paulo, em 2004, foi relatado a presença de *Mycoplasma* sp. como agente causador de artrite em ovinos, contudo a espécie não foi identificada (GREGORY et al., 2004). Os primeiros surtos de Agalaxia contagiosa ocasionada por *M. agalactiae* foram identificados na Paraíba entre 2001 e 2002 (DE AZEVEDO et al., 2006). Os animais apresentaram mastite, poliartrite, conjuntivite, febre e anorexia, morbidade de até 100%, mortalidade de até 36% e 84 animais foram eutanasiados para controle da doença (DE AZEVEDO et al., 2006). Posteriormente, *M. agalactiae* foi identificado novamente em amostras de leite (BANDEIRA et al., 2008; PEIXOTO et al., 2018; LOPES et al., 2019; MATOS et al., 2019) e sêmen (ALVES et al., 2013) de cabra no nordeste brasileiro e em amostras de leite no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2014). Na Bahia, recentemente foi detectado, pela primeira vez, DNA de *M. agalactiae* em amostra de *swab* de caprinos (4,5%) (n=6) de propriedades do sudoeste do estado (CASTILHO JUNIOR et al., 2021). Infecção congênita em cabras também foram descritas no país (SILVA et al., 2014). Prevalência sorológica, na Paraíba, de até 48% foi identificada (GOMES, 2016).

A infecção por *M. agalactiae* inicialmente causa febre alta, seguida de disseminação hematogênica, atinge as articulações, olhos e glândulas mamárias, sinais da tríade clássica. A atrofia da glândula mamária e diminuição ou ausência na produção de leite é o principal sinal clínico em animais em amamentação, seguido por artrite, conjuntivite, aborto e problemas respiratórios. Em animais adultos ocorre a artrite, conjuntivite e alterações respiratórias. Em animais jovens destacam-se os distúrbios respiratórios, articulares e oculares. Problemas respiratórios e genitais podem também ser considerados como sinais “atípicos” da doença (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997).

A hipogalaxia pode ser transitória, abrupta ou total, unilateral ou bilateral. Ocorre a artrite ou poliartrose, com edema doloroso e acúmulo de líquido sinovial nas articulações do carpo e do tarso e pode evoluir para a perda de motilidade na doença crônica. A conjuntivite pode progredir para ceratite parenquimatosa com revascularização da córnea de um ou ambos os olhos, podendo evoluir causando cegueira (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; KUMAR et al., 2014). Com menos frequência, podem ocorrer aborto ou natimortos devido à inflamação do útero (KUMAR et al., 2014; HOSSEIN ABADI et al., 2019). Lesões cerebrais em ovelhas infectadas experimentalmente por *M. agalactiae* foram descritas e provavelmente a presença do micoplasma estava relacionada à encefalite não purulenta e ataxia em animais jovens (ROSALES et al., 2017). Contudo a tríade de sintomas mamários, oculares e articulares caracteriza a agalaxia contagiosa, porém nem sempre ocorrem simultaneamente. As formas subclínicas ou assintomáticas têm sido relatadas resultando na disseminação ambiental pelo leite e outros fluidos do animal dificultando o controle do agente no rebanho (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; GLEW et al., 2000b; SANCHIS et al., 2000; ADDIS et al., 2011).

Inicialmente, *M. agalactiae* e *M. bovis* foram considerados ser a mesma espécie devido às similaridades morfológicas, antigênicas e de vias metabólicas, dificultando distingui-los (RAZIN, 1968; KUMAR et al., 2014). Ambos compartilham >99,8% de similaridade na sequência do 16S rRNA e foram agrupados filogeneticamente no *cluster M. lipophilum* do grupo hominis (PETTERSSON; UHLEN; JOHANSSON, 1996). Atualmente, *M. agalactiae* está agrupado no *cluster bovis* baseado na árvore filogenética construída a partir das análises dos genes *adk*, *efp*, *gmk* e *gyrB* (THOMPSON et al., 2011). As análises confirmaram que essas espécies são geneticamente relacionadas, mas não são idênticas, além de não compartilharem nenhum polimorfismo na sequência gênica do 16S rRNA (PETTERSSON; UHLEN; JOHANSSON, 1996).

2.4 Controle da agalaxia contagiosa

2.4.1 Terapia antimicrobiana

Terapia antimicrobiana é a principal forma de controle da agalaxia contagiosa (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Contudo, alguns fatores devem ser considerados na administração de antibióticos em infecções por *Mycoplasma* sp., uma vez que não possuem parede celular e não possuem algumas vias metabólicas ou vias incompletas, como descrito anteriormente. Portanto, possuem resistência intrínseca à antibióticos como β -lactâmicos, glicopeptídeos e fosfomicina, que atuam na síntese da parede celular e são ineficazes nesses micro-organismos. Além disso, também possuem resistência natural à rifampicina (devido à uma mutação no gene *rpoB*), polimixina, sulfonamidas e quinolonas de primeira geração (devido a ausência de lipopolissacarídeos e síntese de ácido fólico). Desta maneira são usados tetraciclina, macrolídeos e pleuromutolinas os quais inibem a síntese proteica ligando na subunidade 50S ou 30S ribossomal ou antibióticos que inibem a replicação do DNA, como o uso de fluoroquinolonas (GAUTIER-BOUCHARDON, 2018).

A sensibilidade de *M. agalactiae* a antibióticos tem sido mencionada. A enrofloxacin mostrou-se eficaz contra *M. agalactiae*, assim como a tilosina e tetraciclina. Contudo, alguns isolados do micoplasma apresentaram valores de MIC maior que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para tetraciclina, tilosina e espiramicina (LORIA et al., 2003). Estudos posteriores também verificaram a sensibilidade para enrofloxacin, ciprofloxacina e tilosina (PATERNA et al., 2013). Quinolonas e clindamicina também demonstraram serem eficazes contra isolados de *M. agalactiae* obtidos de amostras de leite de ovelhas enquanto, os mesmos isolados demonstraram valores de MIC mais altos com eritromicina, cloranfenicol e macrolídeos (DE GARNICA et al., 2013). Outro estudo menciona que fluoroquinolonas, tetraciclina e macrolídeos foram os antibióticos mais efetivos contra *M. agalactiae*, e apresentou resistência à estreptomicina, eritromicina e ácido naldixico (ANTUNES et al., 2008). Em amostras de *M. agalactiae* isoladas de cabras obtidas ao longo de 25 anos, verificou-se aumento do MIC para tetraciclina e macrolídeos, exceto fluoroquinolonas. Por outro lado, em isolados de ovinos, o aumento do MIC foi observado apenas em alguns macrolídeos (POUMARAT et al., 2016). Outros autores relataram também resistência à eritromicina e tetraciclina (FILIOUSSIS et al., 2014).

Contudo, se a dose terapêutica não é bem definida e o antibiótico ideal não é administrado por período suficiente, resultados no tratamento podem ser ineficazes. O micro-organismo pode continuar a ser disseminado no ambiente, outros animais podem ser infectados e isolados resistentes podem ser selecionadas (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

2.4.2 Vacinologia

Diversas vacinas foram desenvolvidas ou propostas na micoplasmologia humana e animal, poucas são satisfatórias para animais, e grande parte apresentou limitações na prevenção das respectivas doenças ou apresentaram características de indução de resposta auto-imune (RUFFIN, 2001; NICHOLAS; AYLING; MCAULIFFE, 2009a).

Para *Mycoplasma agactiae*, na Itália, usou-se por muito tempo vacinas autógenas, de eficácia não comprovada, obtidas de homogeneizados de leite, cérebro e glândula mamária de ovelhas infectadas. Entretanto, o uso desse tipo de vacina foi interrompido devido sua relação com surto grave de *scrapie* em 1997 e 1998 (CARAMELLI et al., 2001). Em estudo prospectivo observou que províncias onde essa vacina foi administrada resultou em maiores taxas da doença quando comparadas com províncias onde a vacina não foi administrada (BERTOLINI et al., 2012).

Vacinas atenuadas ou vacinas inativadas contra Agalaxia contagiosa são as mais estudadas e mais utilizadas. As primeiras são conhecidas por fornecerem melhor imunidade (FOGGIE et al., 1971). Vacinas atenuadas têm sido usadas na Turquia e demonstraram ser mais protetoras, contudo seu uso não é permitido em muitos países, inclusive em países da Europa (NICHOLAS; AYLING; MCAULIFFE, 2009b; OIE, 2018). Além disso, elas podem promover uma infecção temporária e por esse motivo, não são recomendadas para animais lactantes (OIE, 2018).

Vacinas inativadas, por outro lado, são permitidas na maioria dos países. Diversas formulações vacinais têm sido avaliadas. Estudos prévios avaliaram que tanto vacinas inativadas com saponina como vacinas inativadas com fenol são protetoras contra Agalaxia contagiosa causada por *M. agalactiae* (TOLA et al., 1999). Vacinas inativadas com formalina e administradas com hidróxido de alumínio ou hidróxido de alumínio mais saponina demonstraram serem capazes de diminuir os sinais clínicos, mas não forneceram completa prevenção à doença (DE LA FE et al., 2007b). Técnicas de inativação por formaldeído e fenol

foram comparadas e foi demonstrado que ambas vacinas produziram resposta imune humoral em cabras por no mínimo 6 meses (DE LA FE et al., 2007a). Outro estudo avaliando adjuvantes oleosos na composição vacinal observou melhores resultados ao usar a composição de Montanide ISA-563, Marcol-52 e Montane-80 (razão 30%, 63%, 7% respectivamente), as quais foram não apenas amplamente protetora, mas também impediu o desenvolvimento de sinais clínicos e infecção por *M. agalactiae* (BUONAVOGLIA et al., 2008).

No Brasil não há vacinas comerciais disponíveis, como também, não há legislações disponíveis quanto ao seu uso. Estudos nacionais também observaram maior efeito protetor em vacinas inativadas administradas com adjuvantes oleosos quando comparadas à vacinas com adjuvantes aquosos (ALCÂNTARA et al., 2013).

Outra alternativa vacinal foi a vacina de DNA formulada a partir do gene codificador da lipoproteína P48 estudada em camundongos BALB/c. Esta, demonstrou induzir resposta imune tanto Th1 quando Th2 (CHESSA et al., 2009).

2.5 *Mycoplasma agalactiae*

Até o momento, apenas sete isolados de *M. agalactiae* foram sequenciados: 5632 (NOUVEL et al., 2010), JF4428 (FREY; LISANDRA; RYCHENER, 2016), PG2 (SIRAND-PUGNET et al., 2007), GrTh01 (FILIOUSSIS e FREY, 2019), 7784 (MONTERO-BLAY et al., 2019), 4867 (DORDET-FRISONI et al., 2019) e 14628 (TARDY et al., 2012). Destes, apenas os quatro primeiros genomas estão fechados e disponíveis em banco de dados públicos. O tamanho médio do genoma dessa bactéria é de 897 Kpb (1010 - 853 Kpb), 29,7% de conteúdo GC e em média 690 CDS. Assim como outros micoplasmas, *M. agalactiae* também usa o códon UGA como codificador de triptofano em vez de um códon de parada universal da síntese proteica (BERGEY, 2010). Apesar de poucos genomas e estudos publicados, informações importantes sobre o conteúdo gênico dessa bactéria são viáveis.

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 (SIRAND-PUGNET et al., 2007). Posteriormente foi descrito que *M. agalactiae* possui dois mecanismos conjugativos. O primeiro, é a disseminação horizontal convencional de um ICE, denominado ICEA, (Elemento

Integrativo e Conjugativo - elementos genéticos móveis auto-transmissíveis que codificam sua excisão e transferência por conjugação e integração no genoma da célula receptora). Nesse processo, informações genéticas são transferidas de células ICE-positivas para ICE-negativas. E um segundo mecanismo conjugativo (diferente do modelo Hfr ou *oriT*) o qual permite realizar transferências cromossômicas, de células ICE-negativas para ICE-positivas, de até 17% do seu genoma tanto de genes *cores* quanto de genes acessórios resultando em ganho/ perda simultâneo de até 35 CDS além de criar variações genéticas que podem alterar a regulação e/ ou expressão de genes, caracterizando um mecanismo atípico de transferência horizontal de genes. Desta maneira, qualquer loci pode ser transferido em qualquer combinação, contribuindo para sua diversidade genética. É necessário que a autotransmissão horizontal do ICE e a transferência cromossômica ocorram simultaneamente e possuam a mesma frequência entre as células para que ocorra a transferência (DORDET-FRISONI et al., 2014, 2019).

M. agalactiae possui importantes lipoproteínas de superfície variáveis, denominadas Vpmas ou Agr, as quais realizam rearranjos de DNA dentro do locus gênico *vpma*. (FLITMANTENE et al., 2000; GLEW et al., 2000b). Essa variação antigênica em *M. agalactiae* consiste em uma variação de fase ou tamanho de alta frequência que afetam a expressão (variação de fase) e / ou a estrutura (variação de tamanho) de cada gene da família multigênica (GLEW et al., 2000b). Na estirpe PG2 foram identificados seis genes agrupados no locus *vpma* e uma recombinase, Xer1 (GLEW et al., 2002), posteriormente, foi demonstrado por meio da inativação de *xer1*, que a enzima codificada por esse gene é essencial para a variabilidade de Vpmas, a qual foi reestabelecida após complementação (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2008). Ao comparar a estirpe PG2 e o isolado 5632 foi evidenciado que, além de 5632 possuir cerca de 76% de material genético adicional composto por elementos genéticos móveis, 5632 também possui 95 CDS adicionais, dentre elas, 23 CDS relacionadas ao locus *vpma* (apenas 6 genes na estirpe PG2) (NOUVEL et al., 2010). Os 23 genes *vpma* estão presentes em dois loci, locus I e II, com 16 e 7 genes, respectivamente, sendo que todos os genes do locus II estão também presentes no locus I, contudo, ao avaliar 92 amostras deste micoplasma, a presença do locus II só foi identificado em 3 estirpes, demonstrando que a presença do locus II de *vpma* é um evento raro, enquanto o locus I foi identificado em todas as amostras analisadas. A presença de dois loci *vpma* permite a expressão de duas Vpmas concomitantes multiplicando o número de combinações possíveis nas moléculas de superfície (NOUVEL et al., 2009). O escape do sistema imune também tem sido estudado *in vitro*. Ao usar anticorpos específicos anti-Vpma, verificou-se que Xer1 medeia mudança fenotípica para um Vpma alternativo, o anticorpo causa

repressão do Vpma alvo e induz a expressão de outra molécula do locus *vpma*. Contudo, a variação antigênica continua se *xer1* é inativado por meio de deleções intragênicas e quimeras de genes demonstrando regulação da expressão gênica sob pressão imunológica (CZURDA et al., 2017).

Em geral, micoplasmas são caracterizados por vias metabólicas incompletas. Metabolicamente *M. agalactiae* não fermenta glicose, nem hidrolisa arginina ou metaboliza ureia, ao contrário da maioria das espécies da família Micoplasmataceae (KUMAR et al., 2014). *M. agalactiae* não possui genes codificadores de transportadores envolvidos no metabolismo de glicose, glicose fosfotransferase (PTS) (*ptsG*), frutose e manose (*fruA*), manitol (*mtlA*) e glicerofosfolina (*glpU*). Da mesma maneira, algumas enzimas citoplasmáticas exclusivas do metabolismo dessas moléculas também estão ausentes no genoma (*fruK*, *mtlD* e *glpQ*), assim como a fosfofrutoquinase (Pfk). Contudo, genes codificadores da lactato desidrogenase, álcool desidrogenase e acetato quinase estão presentes em duas cópias no genoma de *M. agalactiae* enquanto em *M. pneumoniae* estão presentes em uma única cópia. Além disso, *M. agalactiae* não possui gene para o metabolismo de arginina e usa lactato, piruvato e/ou glicerol como fonte de carbono como demonstrado experimentalmente por MONTERO-BLAY et al., (2020).

2.5.1 Patogenicidade e proteínas de membrana de *Mycoplasma agalactiae*

Apesar das informações do sequenciamento de *M. agalactiae* nos últimos anos, pouco se sabe sobre os mecanismos de sua virulência e patogenicidade. Estudo do proteoma de proteínas lipossolúveis identificou que a estirpe PG2 possui 194 moléculas de superfície, correspondendo à 26% de todos genes, a maioria dessas (19%) de função desconhecida (CACCIOTTO et al., 2010). O mesmo estudo identificou que a estirpe PG2 e dois isolados de campo possuem diferenças na expressão proteica (CACCIOTTO et al., 2010). Estudos de variabilidade antigênica entre a fração lipossolúvel de 80 isolados de quatro diferentes regiões da Itália e PG2 evidenciaram várias proteínas comuns entre 40 e 90 KDa, e proteínas imunodominantes de 50 e 80 KDa (TOLA et al., 1996). Entretanto, análises de 29 isolados de campo de ovelhas e cabras de regiões da França, uma estirpe vacinal (190) e a estirpe PG2 demonstraram perfis proteicos similares, mas com perfis antigênicos diferentes de acordo com a origem geográfica: um grupo de amostras demonstrou fraca antigenicidade em proteínas entre 25 e 36 KDa e outro grupo apresentou forte perfil antigênico entre proteínas com o mesmo peso molecular do grupo anterior, principalmente de proteínas com 29 KDa (SOLSONA;

LAMBERT; POUMARAT, 1996). Análises mais amplas, com 245 isolados de campo originados de diversos países, permitiu agrupar sorologicamente os micro-organismos em oito sorotipos (A-H), a maioria desses (79,3%) foram classificados como pertencentes ao sorogrupo A, além disso, quatro sorotipos exibiram alta variação fenotípica em sua superfície (BERGONIER et al., 1996).

A primeira molécula de superfície funcionalmente caracterizada desse micro-organismo foi a lipoproteína imunodominante P48 (ROSATI et al., 1999, 2000; CHEEMA et al., 2017). Em seguida foi descrito a proteína P30, a qual possui baixa homologia (25% de identidade) com lipoproteínas variáveis na superfície de *M. bovis*. A P30 induz anticorpos que persistem no mínimo dois meses pós-infecção. Apesar de P30 ser específica de *M. agalactiae*, essa proteína de membrana não está presente em todas os isolados (ausente nos sorotipos E, F, G e H), além de apresentar pequenas variações nas sequências, contudo não apresenta alta frequência de variação de fase (FLEURY et al., 2001). A lipoproteína P40 por sua vez, também demonstrou ser um antígeno imunodominante, induziu produção de anticorpos no mínimo por três meses após infecção experimental em ovelhas, e ao contrário da proteína P30, P40 está ausente apenas no sorotipo C (devido a inserções ou deleções causando a interrupção prematura na tradução) (sorotipo C representa 3,6% dos isolados de *M. agalactiae*) (Bergonier et al., 1996), contudo apresenta níveis de expressão variada entre os isolados (FLEURY et al., 2001). A diferença de expressão pode estar relacionada a variações na sequência -10 do promotor, a regiões *upstream* e diferentes códons de iniciação na região de ligação ao ribossomo. Pequenas variações no tamanho da proteína entre isolados também foram descritas. A P40 foi caracterizada como uma proteína de membrana com função de citoadesina (FLEURY et al., 2002). *M. agalactiae* mutantes para o gene codificador do piruvato desidrogenase demonstrou que essa molécula está envolvida no crescimento e morfologia *in vitro*, as colônias apresentaram menor tamanho e não possuíam a característica típica de “ovo frito”, além disso, a cepa mutante perdeu o potencial de invasividade quando comparado com a cepa selvagem e a complementar (HEGDE; ROSENGARTEN; CHOPRA-DEWASTHALY, 2015). Outra proteína, MAG_5040 foi classificada como uma lipoproteína contendo o domínio SNase de *Staphylococcus aureus*, e foi caracterizada como a primeira proteína com atividade de endo e exonuclease descrita nessa espécie (CACCIOTTO et al., 2013). Três peptídeos sintéticos baseados nas sequências das lipoproteínas P48, P80 e MAG_1000 combinadas ou usadas individualmente foram capazes de induzir NETose em neutrófilos de ovelhas. Este resultado,

pode não estar relacionado à sequência específica de aminoácidos e induziu produção de IL-8 e ativação de TLR-2 (CACCIOTTO et al., 2016).

Inoculações intramamárias experimentais em ovelhas com a estirpe PG2 mutante com genes interrompidos por transposons e seleção negativa, identificou sete genes envolvidos com a infecção local. Destacam-se genes que codificam as proteínas hipotéticas, MAG3390 e MAG4460. A primeira, não possui homologia com outro gene em espécies de micoplasmas e nenhum motivo funcional. A segunda, possui 83% de identidade com a lipoproteína MBOVPG45_0528 de *M. bovis* e um motivo fosfatase-hidrolase. Além disso foram identificados genes codificadores de duas proteínas MAG1050 e MAG2540 preditas como lipoproteínas e os genes *uhpT* (proteína de transporte), *eutD* (fosfotransacetilase) e *adhT* (álcool desidrogenase) (HEGDE et al., 2015b).

As lipoproteínas de *M. agalactiae* mais descritas são as Vpma, ou também chamadas de Avg (FLITMAN-TENE et al., 2000; GLEW et al., 2000b). São lipoproteínas importantes que possuem alta frequência de variação de fase (NOUVEL et al., 2009). *In vivo*, mutantes parciais de Vpma expressando apenas VpmaU e VpmaY demonstraram induzir reduzida imunogenicidade ao longo de 26 dias de infecção comparado com a estirpe selvagem, PG2, além de aumentar a carga bacteriana em amostras de leite. Animais infectados com a estirpe selvagem também apresentaram neutropenia e linfopenia mais precoce e/ ou mais forte quando comparado ao grupo infectado com a estirpe mutante. Todas ovelhas infectadas com PG2 ou com os mutantes desenvolveram mastite severa diminuindo a produção de leite. Observou-se maior frequência de isolamento de *M. agalactiae* em amostras de leite de animais infectados com PG2 do que em animais infectados com a estirpe mutante, demonstrando que a variação de fase em Vpma pode ter função importante na disseminação, colonização e persistência da infecção em ovelhas infectadas ou que outros Vpmas (VpmaW, VpmaX, VpmaZ e VpmaV) presentes em PG2, mas ausentes nos mutantes, fornecem vantagem seletiva na disseminação e invasão do úbere (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2012). *In vivo*, Vpma demonstrou ser independente de Xer-1, uma vez que PG2 foi capaz de expressar novos Vpmas em estirpes que expressavam apenas VpmaU e VpmaY *in vitro* e mutantes para a recombinase *xer-1*, provavelmente pela pressão seletiva induzida pela resposta imune do hospedeiro. As infecções *in vivo* com mutantes expressando Vpma Y demonstraram maior *fitness*, principalmente no início de infecções intramamárias e conjuntivais (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2017). Além disso, foi observado que PG2 mutante expressando apenas VpmaV possui maior taxa de adesão, ao contrário dos mutantes expressando apenas VpmaU que possuem a menor taxa de

adesão em células HeLa, células mamárias epiteliais e estromais de ovelhas, caracterizando essas moléculas também como importantes citoadesinas de *M. agalactiae* (HEGDE et al., 2018). Apesar dessas moléculas estarem envolvidas na adesão celular elas são incapazes de se ligarem à fibronectina e plasminogênio bovino (HEGDE et al., 2018).

Inicialmente acreditava-se que *M. agalactiae* não possuísse capacidade de invasão à células não fagocíticas (ADDIS et al., 2011), contudo, esse micro-organismo invade células primárias mamárias e uterinas de ovelhas (tanto células epiteliais quanto células estromais) (HEGDE et al., 2015a), células HeLa, BEND (células de endométrio bovino) e BLF (fibroblastos de pulmão de búfalo) (HEGDE et al., 2014). Dentre todas Vpma, VpmaU parece ser a proteína com menor capacidade invasiva e VpmaV indicou maior taxa de invasão em células HeLa (HEGDE et al., 2018).

Recentemente, análises de bioinformática (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020), confirmaram estudos anteriores (CACCIOTTO et al., 2010), ao identificar 156 proteínas localizadas ou associadas à membrana a partir do genoma da estirpe PG2. Entre elas, duas novas proteínas foram caracterizadas como antigênicas e imunogênicas por análises *in silico*, são: MAG_1560 (WP_011949336.1) e MAG_6130 (WP_011949770.1) (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020).

2.6 Resposta ao dano no DNA (DNA Damage Response – DDR)

As células são expostas a fatores prejudiciais à estabilidade e integridade do genoma. Diferentes fatores podem levar a diferentes tipos de danos ao DNA. A radiação ionizante e drogas quimioterápicas podem levar a quebras de fita dupla no DNA (DSBs). A luz ultravioleta pode resultar em quebras de fita simples (SSBs) e de fita dupla no DNA. Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem causar quebras de fita simples e erros de replicação podem levar a danos de incompatibilidade (WANG et al., 2020). As infecções bacterianas também causam danos e prejudicam o reparo do DNA (ŽGUR-BERTOK, 2013). Bactérias podem ativar vias de reparo ao DNA por efeitos diretos pela produção de genotoxinas ou indiretamente pelo estímulo de ROS ou RNS (espécies reativas de nitrogênio) as quais ativam, de forma prolongada ou excessiva, células do sistema imune do hospedeiro (ESPINOZA; MINAMI, 2018). Dependendo da extensão do dano ao DNA pode ocorrer parada do ciclo celular, reparo do DNA, senescência ou apoptose (CICCIA; ELLEDGE, 2010).

Para conter os danos, a célula possui vários mecanismos de reparo específicos ao tipo de lesão. Esse processo é denominado como Resposta de Dano ao DNA (*DNA Damage Response* – DDR). Os mecanismos de reparo, são: I) bases de DNA danificadas são substituídas por bases corretas por reparo de incompatibilidade (MMR); II) pequenas alterações químicas de bases de DNA são reparadas por reparo de excisão de base (BER) por meio da excisão da base danificada; III) dímeros de pirimidina e ligações cruzadas intra-cadeia, são corrigidas por reparo de excisão de nucleotídeos (NER) por meio da remoção de um oligonucleotídeo de aproximadamente 30 pb contendo as bases danificadas; IV) ICLs (lesões do tipo ligação cruzada inter-fita) são excisados por reparo de ligações cruzadas entre cadeias por meio de proteínas envolvidas na síndrome genética de anemia de Fanconi; V) SSBs são reparados por *single-strand break repair* (SSBR); VI) DSBs são processados por junção de extremidade não homóloga (NHEJ), recombinação homóloga (HR) ou junção de extremidade mediada por micro-homologia (MMEJ) (CICCIA; ELLEDGE, 2010; WANG et al., 2020).

A ativação da resposta de dano ao DNA é controlada por três proteínas quinases: ATM, DNA-PK e ATR e pela PARP (CICCIA; ELLEDGE, 2010; ESPINOZA; MINAMI, 2018). ATM e DNA-PK são recrutados por DSB, entretanto, uma vez que DNA-PK coordena o reparo de DSB via junção não homóloga, ATM promove recombinação homóloga e parada do ciclo celular em vários pontos de verificação. ATM e DNA-PK atuam em cooperação com o complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) ativando quinases. Um mediador chave do sinal ATM é a quinase, Chk2, que induz o *checkpoint* em G1/ S via inativação Cdk2 ou pode bloquear o ciclo celular em G2/ M evitando a formação do complexo ciclina B1/ Cdk1. DNA-PK desempenha um papel crítico em DSB ao recrutar XRCC4/ LIG4, os quais promovem a religação das fitas com dano com o auxílio do fator estimulador XLF (CICCIA; ELLEDGE, 2010; ESPINOZA; MINAMI, 2018).

O ATR é ativado em resposta ao DNA de fita única e atua no ponto de verificação da fase S. Após o reconhecimento do dano ao DNA, ocorre ativação de p53, CHK1, CHK2, BRCA e H2AX. Por outro lado, o Chk1, desencadeado pelo sinal ATR, ativa a fosfatase Cdc25A e Treslina, que induzem a parada das fases G2 e S (CICCIA; ELLEDGE, 2010; BLACKFORD; JACKSON, 2017; ESPINOZA; MINAMI, 2018).

PARP1 e PARP2 reconhecem SSBs e DSBs e se ligam ao DNA, contribuem para a reorganização da cromatina e o recrutamento de XRCC1 e LIG3, as quais promovem o reparo de SSB após o processamento final do DNA por proteínas que interagem com XRCC1, como DNA polimerase β , PNK e nucleases. Em DSBs, PARP1 medeia o acúmulo inicial do complexo

MRN para a dupla fita de maneira independente de γ H2AX e MDC1, além disso, PARP1 também ativa ATM, embora também possam atuar independentemente (CICCIA; ELLEDGE, 2010). A histona γ H2AX recruta também TP53BP1 e as ubiquitinas RNF8 e RNF168 (BURGER; KETLEY; GULLEROVA, 2019).

Grandes lesões no DNA podem levar à interrupção da síntese da fita principal na forquilha de replicação e formação de extensas regiões de ssDNA revestidas com RPA devido ao desacoplamento entre helicase e a DNA polimerase. O complexo RPA-ssDNA recruta o complexo ATR/ ATRIP e estimula a ligação e ativação de RAD17-RFC2-5, que carrega o heterotrîmero, relacionado ao PCNA, RAD9-HUS1-RAD1 (9-1-1) ligando-se à proteína TOPBP1 ativadora de ATR, a qual estimula a atividade de ATR. O complexo 9-1-1 é direcionado às extremidades 5'- ou 3' do DNA adjacentes às regiões ssDNA revestidas com RPA. É a co-localização desses complexos dependentes de RPA que ativa a cascata de sinalização ATR, resultando na ativação da sinalização de quinase CHK1 e CHK2 e fosforilação de muitos fatores ligados à cromatina para promover a estabilidade e reinício da forquilha de replicação (CICCIA; ELLEDGE, 2010; BLACKFORD; JACKSON, 2017).

Vias de sinalização de dano e respostas de reparo ao DNA estimuladas por bactérias à célula hospedeira têm sido estudadas principalmente em infecções de *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* sorovar *Typhi* e *Bacteriodes fragilis*. Destacam-se algumas genotoxinas capazes de estimular DDR, as quais são: toxinas distensivas citoletais (CDT), colibactina (em *E. coli*), toxina shiga (produzida por *Shigella dysenteriae*) e endonucleases (produzida por *Neisseria gonorrhoeae*) (ŽGUR-BERTOK, 2013; GAGNAIRE et al., 2017). Infecções por *H. pylori* ativam vias de DDR, com ativação de ATM, embora também ocorra inativação de ATR, MRE11, e NBS, e promoção de DSBs ou por contato direto da célula com o patógeno ou indiretamente, devido o processo inflamatório crônico (KALISPERATI et al., 2017). CDT induz ATM e ATR em resposta ao dano ao DNA em fibroblastos humanos, a partir da quebra da dupla fita de DNA, resultando em recombinação homóloga e não homóloga no reparo da lesão (FAHRER et al., 2014).

Dessa maneira, entender como as proteínas de membrana de *M. agalactiae* P40, MAG_1560 e MAG_6130 atuam durante a infecção em células hospedeiras, auxiliará a compreender o estabelecimento da imunopatogênese na Agalaxia contagiosa causada por esse micro-organismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Avaliar a imunogenicidade, função e citotoxicidade de proteínas de membrana recombinantes (P40, MAG_1560 e MAG_6130) de *Mycoplasma agalactiae*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a localização e expressão celular das proteínas de membrana P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *Mycoplasma agalactiae*;
- Avaliar funcionalmente as proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *M. agalactiae* como adesinas microbianas;
- Avaliar a adesão das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *M. agalactiae* ao plasminogênio, lactoferrina e às moléculas da matriz extracelular (fibronectina e fibrinogênio).
- Determinar o potencial citotóxico das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *M. agalactiae*;
- Avaliar a expressão de genes envolvidos na sinalização de dano ao DNA após estímulo das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *M. agalactiae in vitro*.

4 METODOLOGIA

4.1 Estirpes bacterianas, linhagens celulares e condições de cultura

Mycoplasma agalactiae isolado GM139 (isolado de leite de cabra com mastite - Califórnia, EUA) e estirpe PG2 (isolado de ovelha infectada – Madri, Espanha) foram utilizadas neste estudo. As bactérias foram cultivadas a 37 °C em meio SP4 suplementado com penicilina e vermelho de fenol como indicador de pH. Para infecções celulares foram utilizadas células HeLa-229 (CCL-2.1, ATCC, USA) e células mamárias estromais primárias de ovelhas (*sheep primary mammary stromal cells* - MSCs) anteriormente armazenadas em nitrogênio líquido e cultivadas como descritas previamente (Hegde et al. 2015; Hegde et al. 2014). Brevemente, células HeLa foram cultivadas em meio MEM contendo 10% de soro fetal bovino inativado por calor e células MSC foram cultivadas em meio DMEM alta glicose (89%) com 1% de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino inativado por calor. Para os ensaios de adesão foram plaqueadas 5×10^4 células/ poço (HeLa e MSC) em placas de 24 poços (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Germany) 48h antes da infecção. Para os ensaios de viabilidade celular foram plaqueadas 1×10^4 células/ poço (MSC) e 2×10^3 células/poço (HeLa) em placas de 96 poços 24h antes da inoculação. Os ensaios em cultura celular foram realizados, em maioria, no Instituto de Bacteriologia na University of Veterinary Medicine Vienna, Áustria (Vetmeduni). As células foram verificadas periodicamente quanto a contaminação por micoplasmas por PCR e cultura em meio ágar SP4. O número de passagens para células MSC não foi superior a 8 e para células HeLa não foi superior a 30.

4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Nesse estudo foram utilizadas três sequências codificadoras de proteínas de *M. agalactiae* previamente descritas e caracterizadas como antigênicas P40, MAG_1560 e MAG_6130 (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020). Inicialmente, vetores de expressão pET-28a(+) com sítio de resistência a canamicina e contendo as sequências codificadoras das proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130 foram sintetizados pela GenScript (Piscataway, EUA). A sequência de DNA enviada para síntese foi otimizada. Códon TGA (códon de codificação do aminoácido triptofano em micoplasmas e códon de terminação em *Escherichia coli*) foram alterados para TGG (códon codificador de triptofano).

E. coli BL21 StarTM (DE3) One Shot foram utilizadas para expressão proteica. Para transformação foram utilizados 10ng de DNA do plasmídeo e 50µL de células BL21 StarTM (DE3) One Shot, os quais foram homogeneizados 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 Luria Bertani contendo o antibiótico apropriado e incubados overnight a 37 °C com agitação (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020).

As proteínas foram expressas em *Escherichia coli* BL21 StarTM (DE3) *One Shot* contendo o vetor com o inserto de interesse e cultivada em meio Luria Bertani com canamicina (100 µg.mL⁻¹) e IPTG 1 mM, e incubada por 14 horas à 18 °C com agitação. As células foram obtidas por centrifugação (10.000 x g, 10 minutos a 4 °C) e o sedimento 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). O marcador de poli-histidina N-terminal (6xHis) nos vetores e a adição de imidazol à solução permitiram a purificação da proteína recombinante em resina quelante de níquel (HisTrapTM HP, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA) em condições não desnaturantes previamente padronizadas (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). As frações cromatográficas foram visualizadas, para confirmação da purificação e expressão, em SDS-PAGE 12% corado por *Comassie blue* e *Western blot* utilizando o anticorpo primário 6x-His Epitope Tag (InvitrogenTM) e submetidas à diálise em membrana. A concentração das proteínas purificadas foi obtida pela metodologia BCA com detecção colorimétrica (*kit* Pierce BCA *Protein Assay*, Thermo Scientific) (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020).

4.3 Avaliação da localização e expressão celular das proteínas recombinantes

4.3.1 Produção de anticorpos policlonais

A metodologia envolvendo coelhos foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (onde os animais foram obtidos e mantidos até a eutanásia) e do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (número do processo: FMUSP – 944/2017; ICB - 123/ 2016/ CEUA). Soro anti-proteínas recombinantes de *M. agalctiae* foram obtidos de seis coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia, mantidos em gaiolas individuais com alimentação e água *ad libitum*. Foram utilizados dois animais para inoculação de cada proteína recombinante. Antes da inoculação, amostras de sangue dos coelhos foram obtidas pela veia marginal da orelha e utilizado como controle negativo (pré imune). Em seguida foi realizada a imunização por via intramuscular na região do quadríceps, na face posterior da coxa direita e esquerda, (200 µL por sítio, 8-10 sítios/coelho). No dia 1, os coelhos foram inoculados com 500 µg de proteína recombinante homogeneizada com volume igual (v/v) de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich®). Duas imunizações subsequentes com quantidades iguais de proteína e adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich®) foram realizadas em intervalos de duas semanas entre as aplicações. A coleta de sangue pós imunizações, foi realizada a cada sete dias e os soros obtidos foram armazenados a -80 °C. No 42º dia após o início da imunização os animais foram submetidos a exsanguinação por punção cardíaca, após inoculação intramuscular prévia de quetamina (30-40 mg.Kg⁻¹) e xilazina (5-10 mg.Kg⁻¹). Em seguida os animais foram eutanasiados com aplicação endovenosa de tiopental sódico na dose de 40 a 50 mg. Kg⁻¹ de peso. As amostras de soro obtidas foram armazenadas em gelo até o processamento, quando foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos, aliqüotadas e armazenadas a -80 °C até o uso em experimentos posteriores.

4.3.1.1 Avaliação da cinética dos anticorpos policlonais anti-proteínas recombinantes

A titulação de anticorpos anti-proteínas recombinantes nos soros dos coelhos foi obtida pela metodologia de ELISA indireto para avaliar a cinética de sua produção. As reações ocorreram em poços de placas de poliestireno (COSTAR®) previamente sensibilizadas com 200 ng/poço de cada proteína recombinante (P40, MAG_1560, MAG_6130) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 16 horas a 4 °C, em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de PBS - Tween 20 (0,05%). Possíveis reações inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado a 10% em PBS e as placas foram incubadas por uma hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS - Tween 20

(0,05%) e os soros dos coelhos em diferentes diluições (1:50 – 1:51 200) foram expostos às proteínas a temperatura ambiente por uma hora. Para confirmar o reconhecimento das proteínas pelos anticorpos, os poços foram lavados, e anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi adicionado (*Goat anti-Rabbit IgG, HRP conjugate* - Invitrogen™), diluído 1:2000 em PBS com 5% de leite desnatado. Após nova incubação em temperatura ambiente por uma hora, as placas foram lavadas novamente. As reações de reconhecimento das proteínas foram reveladas com o substrato cromógeno OPD (*o-Phenylenediamine Dihydrochloride*) com a adição de peróxido de hidrogênio por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida 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 avaliadas em triplicatas, realizadas três vezes sob as mesmas condições. Para avaliar a presença de ligação cruzada entre os anticorpos policlonais e as proteínas do estudo foi realizado imunoensaio, como descrito a cima.

4.3.1.2 Purificação dos anticorpos policlonais

Os soros anti-proteínas recombinantes foram previamente delipidados e dialisados (KOSTNER et al., 1979), e em seguida, purificados por coluna de afinidade com resina de proteína G (HiTrap™ *Protein G HP*, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA), eluídos em glicina 0,1 M, pH 2,7, neutralizados com Tris-HCl 1M, pH 9,0 e quantificados em nanoespectrofotômetro (D.O. 280 nm). Os anticorpos purificados foram analisados em gel de acrilamida em condições desnaturantes (12%) e não desnaturantes (8%) (sem a presença do agente redutor, sem SDS e sem fervura), corado com *Comassie blue*.

4.3.1.3 Ensaio de avidéz à anticorpos IgG

A razão de afinidade do anticorpo foi medida usando um protocolo de ELISA modificado com tiocianato de amônio (LASARO et al., 2009). Inicialmente, as placas foram revestidas com cada proteína recombinante como mencionado acima e os soros de coelhos foram avaliados em diluições correspondentes a D.O. 492 nm de 1,0. Após a incubação com soro, diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0,125M - 8M) ou PBS foram adicionadas aos poços e incubadas por 15 min no escuro. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpo IgG anti-*rabitt* conjugado com HRP. O efeito do tiocianato de amônio na ligação

antígeno-anticorpo foi determinado dividindo-se a D.O. 492 nm na presença de tiocianato de amônio pela D.O. 492 nm na ausência de tiocianato de amônio e multiplicado por 100. Os valores obtidos com as amostras de soro representam a avidéz do anticorpo.

4.3.2 Avaliação e confirmação da localização celular das proteínas recombinantes

Para avaliar a localização subcelular das moléculas alvo, antígenos totais de *M. agalactiae* GM139 foram separados em frações hidrofóbicas e hidrofílicas pelo método de partição de Triton X-114 com uma cultura de 400 mL do micro-organismo crescido até à fase estacionária em meio SP4 (RAWADI; ROMAN-ROMAN, 1996). As amostras da fase aquosa e orgânica foram homogeneizadas e analisadas em gel de acrilamida 12% e transferidos para membrana de nitrocelulose. A imunorreatividade das proteínas à anticorpos policlonais anti-proteínas recombinantes [anti-P40, anti-MAG_1560 e anti-MAG_6130 ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente)] foi avaliada pela metodologia de *Western blotting*.

4.3.3 Blotting das colônias de *M. agalactiae*

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes foi observada em colônias de *M. agalactiae* isolado GM139 e estirpe PG2. Discos de membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foram depositados sobre a superfície de placas de ágar SP4 com colônias do micro-organismo. Em seguida, as membranas foram expostas a soluções de soros dos coelhos pré imunes e hiperimunes [anti-P40, anti-MAG_1560 e anti-MAG_6130 ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente)] para reconhecimento das proteínas da membrana celular presentes nos decalques das colônias. Após 2 horas de incubação as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes, por 5 minutos, com PBS - Tween 20 0,05% e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase contra IgG de coelho (GE Healthcare) diluído 1:2000. Após três lavagens, a membrana foi corada após adição de 4CN (*4-chloro-1-naphthol*) (Bio-rad) e peróxido de hidrogênio e contra-corada com *Ponceau S* (KHIARI; MARDASSI, 2012). Como controle negativo foram usadas colônias de *M. gallisepticum* e *M. ovipneumoniae* (Apêndice A).

4.4 Avaliação das proteínas como adesinas microbianas

4.4.1 Ensaio de adesão *in vitro* por imunoensaio

As placas de ELISA com 96 poços foram revestidas a 4 °C por 18 horas com proteínas totais da célula, membrana celular ou a fração citosólica de HeLa ou MSC em tampão de bicarbonato-carbonato de sódio (pH 9,6) (100 µg.mL⁻¹/ poço). As frações proteicas das células eucarióticas foram previamente submetidas à extração com Triton TX-114 1%, como previamente descrito (BORDIER, 1981).

Para o ensaio de adesão, após bloqueio dos poços com 5% de leite desnatado, foram adicionadas as proteínas recombinantes (1000 ou 2000 ng.mL⁻¹) diluídas em 100 µL de TBST às cavidades das placas de ELISA. A reação foi incubada a 37 °C por 1h 30min e os poços lavados três vezes com TBST. O anticorpo anti-proteína recombinante foi adicionado (100 µL / poço) e, em seguida incubado à temperatura ambiente por 1h 30min. Após lavagem, o anticorpo secundário anti-rabbit IgG-HRP (1:5000) foi adicionado (100 µL / poço) e a placa incubada a temperatura ambiente por 1h 30min. A absorbância foi avaliada a 492 nm em leitor de microplaca.

Para o ensaio de inibição da adesão, o anti-soro contra a proteína recombinante (1 mg.mL⁻¹) foi diluído em série de 1/20 a 1/1280 e 100 µL de cada diluição foi pré-incubado com 1000-2000 ng.mL⁻¹ de proteína recombinante em 100 µL de TBST a 37 °C por 1 h.

Cada solução anterior (100 µL) foi adicionada aos poços previamente sensibilizados com as frações celulares. As reações de reconhecimento das proteínas recombinantes às frações celulares prosseguiu-se como descrito para o ensaio de adesão acima (Hagemann et al. 2017; Zhao et al. 2017).

4.4.2 Ensaio de adesão em cultura celular em monocamada

Para quantificar a adesão celular de *M. agalactiae* a estirpe PG2 e o isolado GM139 foram incubados com células HeLa e MSC por 4 horas a 37 °C e 5% CO₂. As bactérias não aderidas foram removidas após três lavagens com PBS e diluições seriadas da suspensão de células foram plaqueadas em ágar SP4 após tripsinização. Como controle, a suspensão de micoplasma foi incubada na ausência de células em poços paralelos para quantificar a UFC após 4h de incubação. Adesão foi calculada com a razão da porcentagem da UFC.mL⁻¹ de micoplasmas aderidos após 4h de infecção e UFC.mL⁻¹ de micoplasma nesse mesmo tempo (Hegde et al. 2018).

Para os ensaios de inibição da adesão, a estirpe PG2 foi pré-incubada com anticorpos anti-P40, MAG_1560 ou MAG_6130 (10:1, v/v) por 1h a 37 °C. Após pré-incubação o ensaio prosseguiu como descrito no parágrafo acima. Quaisquer efeitos dos respectivos anti-soros na adesão de PG2 foram avaliados comparando o total de UFC.mL⁻¹ após 4 h de infecção.

4.5 Análise da interação ao plasminogênio, lactoferrina e componentes da matriz extracelular

O ensaio de ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio foi realizado em placas de 96 poços. As proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 (500 ng/ poço) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 foram distribuídas nos poços em volumes de 100 µL e incubadas por 16 horas a 4 °C, em câmara úmida e bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBST- Tween por 2 horas a 37 °C. Após cinco lavagens com TBS-Tween, os poços foram incubados com concentrações variadas de plasminogênio (100,0 – 1,562 µg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich®) em PBS pH 7,4 a 37 °C por 1h30min. A ligação das proteínas ao plasminogênio foi detectada pela adição de IgG anti-plasminogênio de coelho diluído 1:2000 (abcam®), seguido por anticorpo anti-rabbit IgG-HRP (diluído 1:5000). Poços incubados com BSA foram usados como controle negativo para ligação ao plasminogênio. A absorbância da reação foi mensurada a 492 nm em leitor de microplaca (HAGEMANN et al., 2017).

Para o ensaio de ligação de proteínas da matriz extracelular, fibronectina, e fibrinogênio e lactoferrina (Sigma-Aldrich®) (5 - 50,0 µg.mL⁻¹), as moléculas foram diluídas em tampão carbonato- bicarbonato pH 9,6 e adicionados em placas de 96 poços por 16 horas a 4 °C, em câmara úmida, seguido de bloqueio com 5% de leite em TBS-Tween por 2h e 37 °C. Após cinco lavagens com TBS-Tween, os poços foram incubados com as proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 (500 ng / poço) em PBS pH 7,4 a 37 °C por 1h 30min. O reconhecimento das moléculas foi detectado pela adição de IgG anti-coelho diluído 1: 10000 (Sigma-Aldrich®). Os poços incubados com BSA foram usados como controle negativo para ligação (ANDERSON; ENABULELE, 2021). A reação foi mensurada como descrito acima.

4.6 Avaliação da citotoxicidade das proteínas recombinantes

4.6.1 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade celular, inicialmente, foi determinado o tempo ideal de incubação e a densidade de plaqueamento celular. Desta maneira, 100 µL de meio com $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , 1×10^4 e 2×10^4 células/ poço (MSC) ou 5×10^2 , 1×10^3 , 2×10^3 , $2,5 \times 10^3$ e 5×10^3 células/ poço (HeLa) foram incubados em 5% de CO₂ à 37 °C por 18h. Em seguida, as células foram lavadas com 100 µL de PBS, 100 µL de meio foram adicionados em cada poço e as células foram incubadas por 18 h. Em seguida as células foram lavadas com PBS e 90 µL de meio foram adicionados em cada poço; a seguir, foram adicionados 10 µL de alamarBlue™ *HS Cell Viability Reagent* (Invitrogen™). A placa foi incubada a 37 °C, 5% de CO₂ por 24h, 48h e/ou 72h. A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se espectrofotometro nas absorvâncias nos comprimentos de onda a 570 nm e 600 nm a cada hora, por 8, 10 e 24 horas após incubação com alamarBlue™ para células MSC e durante 4 horas para experimentos com células HeLa. Foi realizado três experimentos independentes em triplicatas. A porcentagem de redução do reagente alamarBlue™ foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução do reagente alamarBlue}^{\text{TM}} = \frac{(\text{Eoxi600} \times \text{A570}) - (\text{Eoxi570} \times \text{A600})}{(\text{Ered570} \times \text{C600}) - (\text{Ered600} \times \text{C570})} \times 100$$

Eoxi570 = coeficiente de extinção molar (E) do reagente alamarBlue™ em 570nm = 80586

Eoxi600 = E do reagente alamarBlue™ oxidado em 600nm = 117216

A570 = absorvância dos poços de teste em 570 nm

A600 = absorvância dos poços de teste em 600 nm

Ered570 = E do reagente alamarBlue™ reduzido em 570nm = 155677

Ered600 = E do reagente alamarBlue™ reduzido em 600nm = 14652

C570 = absorvância do controle negativo (meio sem células e reagente alamarBlue™) em 570nm

C600 = absorvância do poço de controle negativo (meio sem células e reagente alamarBlue™) em 600nm.

Após determinação do tempo ótimo de incubação e a densidade de plaqueamento celular, foram adicionados à placa 1×10^4 células/ poço (MSC) ou 2×10^3 células/ poço (HeLa) em placas de 96 poços. Após incubação por 18h a 37 °C e 5% CO₂, as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com as proteínas recombinantes P40, MAG_1560 ou MAG_6130 ($1, 2$ ou $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) diluídas em meio específico para a célula. A placa foi incubada novamente por 48 horas nas mesmas condições. A avaliação da viabilidade celular foi

realizada pelo uso da redução de resazurina (alarmarBlue™ HS *Cell Viability Reagent*, Invitrogen™). A leitura da placa foi realizada após adição do reagente, seguindo hora após hora, até completar 6 horas em leitor de microplaca nos comprimentos de onda de 560 nm e 600 nm. A porcentagem de redução do reagente alarmarBlue™ foi calculada usando a fórmula descrita acima.

4.6.2 Análise da expressão gênica da via de dano ao DNA

A expressão gênica de vias de sinalização de danos ao DNA foi verificada pela metodologia qPCR. Células HeLa foram inoculadas com P40, MAG_1560 ou MAG_6130 (4 µg.mL⁻¹). Após incubação, as células foram tripsinizadas e armazenadas em *RNAlater™ Stabilization Solution* (Thermo Fisher Scientific) a -80 °C até extração de RNA. A extração e purificação de RNA foi realizada pelo Kit RNeasy® (Qiagen, Brasil) seguindo o protocolo do fabricante, em seguida, o RNA extraído foi quantificado por nanoespectrofotometria. O cDNA foi obtido utilizando-se o *kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific) com adição de oligonucleotídeos complementares à cauda poli A do RNAm (*Primers Oligo dT*) e inibidor de RNase. O cDNA obtido foi submetido à análise com a utilização do *kit RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway* (Qiagen) para a expressão de 84 genes envolvidos na resposta do hospedeiro a danos no DNA (Anexo A). Todos os procedimentos e análises foram realizados de acordo com as instruções e *software* do fabricante.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad-Prism 6.0 (GraphPad Software, EUA). Inicialmente, para avaliar se os dados possuem uma distribuição normal foram realizados os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para avaliar a reação cruzada antígeno-anticorpo e a adesão proteica ao plasminogênio, lactoferrina e proteínas da MEC foi realizado o teste *Two way* ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. Para avaliar a adesão entre proteínas recombinantes e frações de células eucarióticas e a viabilidade celular, foi utilizado *One way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, e para analisar a inibição da adesão de *M. agalactiae* na cultura de células em monocamada foi realizado o teste *t de Student*. As análises estatísticas foram calculadas a partir de pelo menos dois experimentos independentes realizados

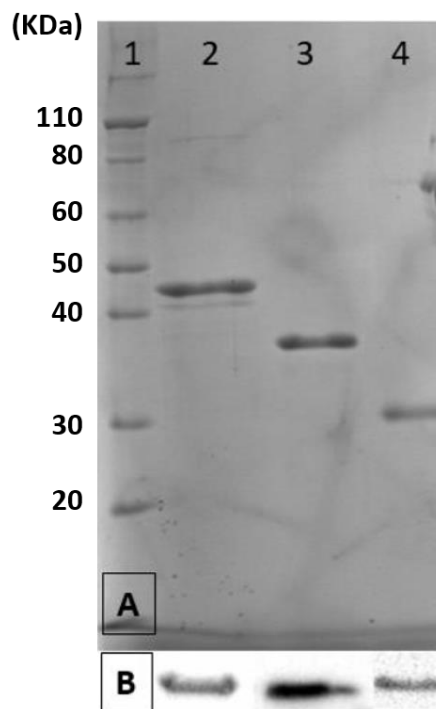
em duplicada ou triplicada. Dados expressos em média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão e purificação de proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae*

As proteínas recombinantes foram expressas em sistema heterólogo usando *E. coli*. As três proteínas recombinantes foram purificadas a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade com resina de níquel e visualizadas em SDS-PAGE (Figura 06). As proteínas purificadas P40, MAG_1560 e MAG_6130 foram reconhecidas por anticorpos anti-histidina por *Western blot*. As proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas em ensaios posteriores.

Figura 06 - Perfil eletroforético das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *Mycoplasma agalactiae*



Legenda: (A) Perfil de pureza das proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae* em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie blue*. (B) *Western blot*: reconhecimento de proteínas por anticorpo anti-histidina (6x-His *Epitope Tag*, Invitrogen™). Coluna 1: Peso molecular Novex® Sharp *Protein Standard*; Coluna 2: P40 (42 KDa); Coluna 3: MAG_1560 (32 KDa); Coluna 4: MAG_6130 (24 KDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Avaliação da localização e expressão celular das proteínas recombinantes

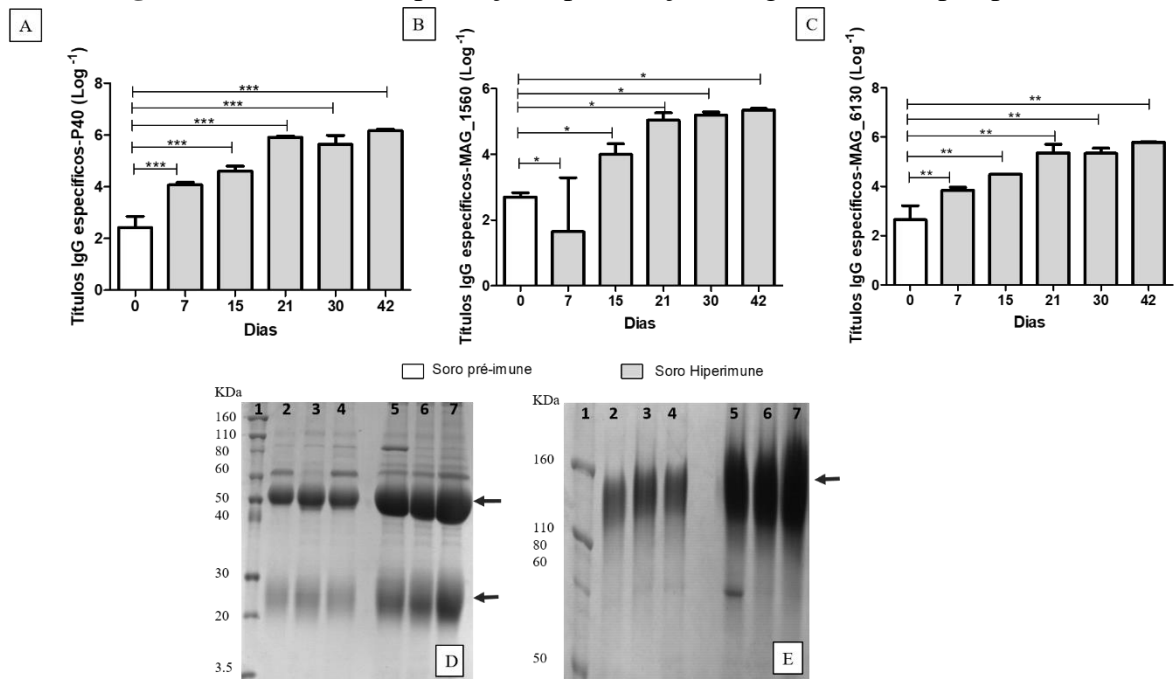
5.2.1 Produção e purificação de anticorpos policlonais

Ao avaliar a cinética da produção de anticorpos dos coelhos inoculados com as proteínas recombinantes observou-se significativo aumento dos anticorpos IgG específicos comparando com o soro pré imune (Figura 07). Observou-se que os coelhos produziram IgG anti-proteínas recombinantes após a primeira dose, intensificando a resposta após inoculações posteriores. Esses resultados indicam que os antígenos são eficientemente imunogênicos em coelhos. Não foi observado reação cruzada entre os anticorpos policlonais produzidos e as proteínas recombinantes em diversas concentrações (Figura 08).

Os anticorpos policlonais anti proteínas recombinantes foram purificados por cromatografia de afinidade após delipidação. A Figura 07 (D e E) apresenta o resultado da purificação dos anticorpos policlonais IgG obtidos do soro pré-imune e do soro hiperimune em condições desnaturantes e em condições não desnaturantes evidenciando o anticorpo (IgG) inteiro com ~150 KDa, a cadeia pesada em ~50 KDa e a cadeia leve em ~25 KDa. Os anticorpos IgG purificados foram utilizados nos ensaios de localização proteica e ensaios celulares posteriores.

A comparação entre a ligação antígenos-anticorpos pré-tratados com diferentes concentrações de solução de tiocianato de amônio ou PBS está apresentado na Figura 09. O agente caotrópico teve efeito ao inibir a ligação entre antígenos e IgG apenas em altas concentrações de tiocianato de amônio (acima de 1M).

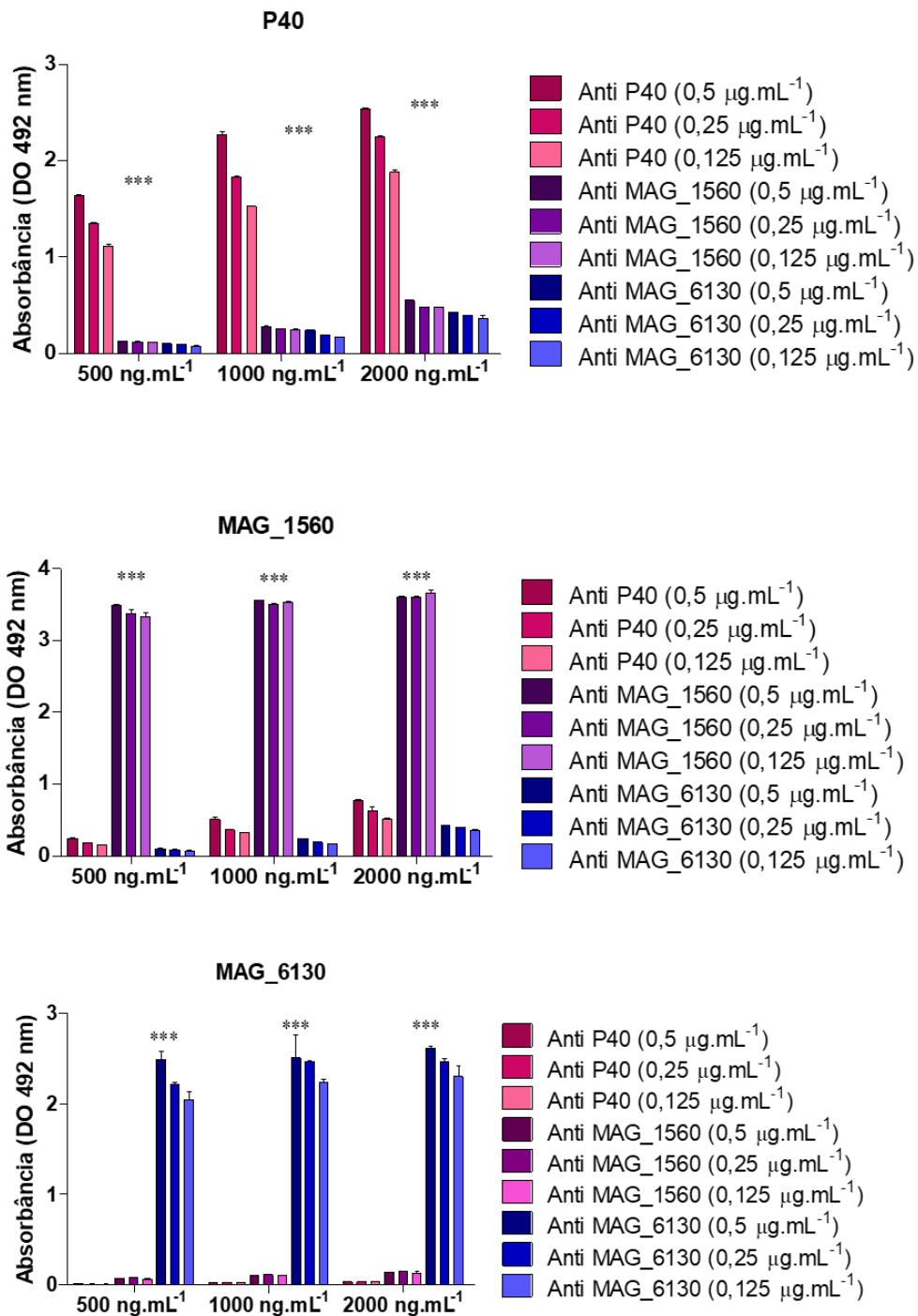
Figura 07 - Cinética da produção e purificação de IgG de anticorpos policlonais



Legenda: (Superior) Análise das respostas IgG específicas contra P40 (A), MAG_1560 (B) e MAG_6130 (C) induzidas em coelhos imunizados com proteínas recombinantes (500 µg) realizadas em amostras de soro de coelho obtidas a cada sete dias por 42 dias. (Inferior) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida de anticorpos IgG específicos, produzidos em coelhos, após delipidação e purificação por cromatografia de afinidade em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições desnaturantes (D); eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 8% sob condições não desnaturantes (E), ambos os géis foram corados com *Coomassie Blue*. Coluna 1: Padrão de peso molecular de proteínas não corado Novex® Sharp. Colunas 2, 3 e 4: Soro pré-imune. Coluna: 5, 6 e 7: Soro hiperimune após imunização com proteínas recombinantes P40, MAG_1560, MAG_6130, respectivamente. As setas em (D) indicam a cadeia pesada de IgG (~ 50 KDa) e a cadeia leve (~ 25 KDa) e a seta em (E) indica o anticorpo IgG não desnaturado em ~ 150KDa. *p < 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,001, (*One way ANOVA* com pós-teste de Bonferroni).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 08 - Análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais específicos anti-P40, anti-MAG_1560 e anti-MAG_6130

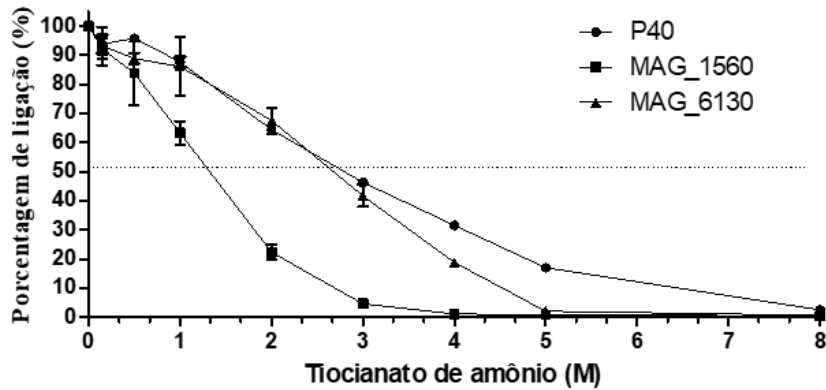


Legenda: Reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos avaliados nas concentrações de 0,5; 0,25 e 0,125 µg.mL⁻¹ e proteínas recombinantes (P40, MAG_1560 e MAG_6130) nas concentrações de 500, 1000 e 2000 ng.mL⁻¹. Foi realizado o teste *Two way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio padrão. (***) $p < 0,001$.

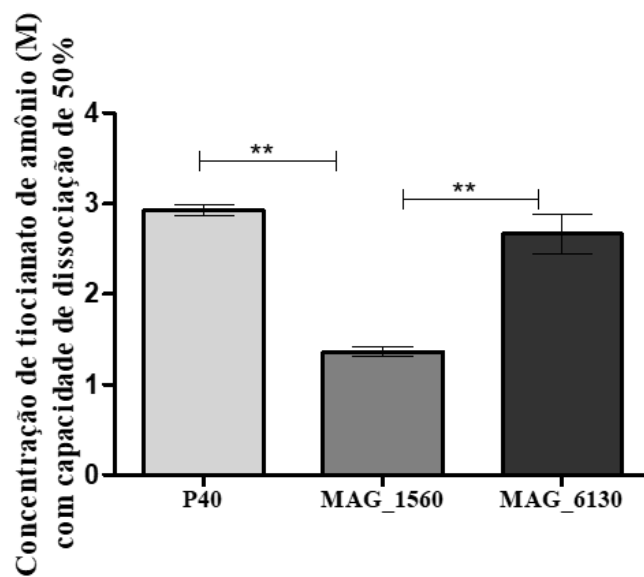
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 09 - Ensaio de afinidade para anticorpos policlonais IgG específicos contra as proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae*

A



B



Legenda: (A) Porcentagem de ligação antígeno-anticorpo em molaridades crescentes de tiocianato de amônio (0 a 8M). (B) Concentração molar do agente caotrópico, tiocianato de amônio, capaz de dissociar 50% da ligação antígeno-anticorpo. O experimento foi realizado independentemente com cada proteína recombinante (P40, MAG_1560 e MAG_6130). Valores representam médias \pm DP. ** $p < 0,05$. *One way* ANOVA com pós teste de Bonferroni.

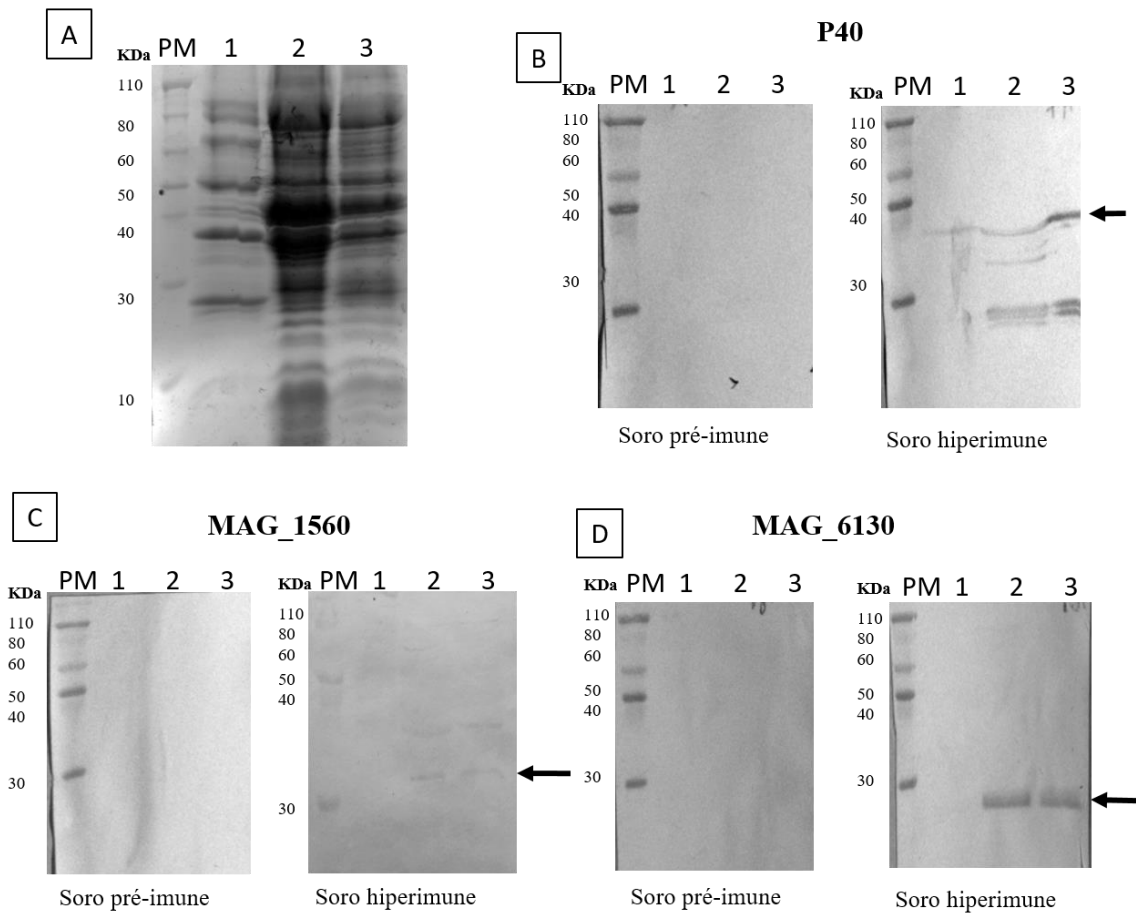
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Avaliação e confirmação da localização celular de proteínas de *M. agalactiae*

As proteínas estudadas *in silico* foram caracterizadas previamente como moléculas indiretamente ligadas à membrana (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020). *Western*

blotting usando a fração hidrossolúvel e lipossolúvel de *M. agalactiae* após extração das lipoproteínas confirmou a localização celular das proteínas MAG_1560 e MAG_6130 como proteínas de membrana, uma vez que o anticorpo policlonal reconheceu mais intensamente a fração lipossolúvel (Figura 10). A lipoproteína P40 foi utilizada como controle positivo.

Figura 10 - Reconhecimento de lipoproteínas de *Mycoplasma agalactiae* com anticorpos policlonais específicos



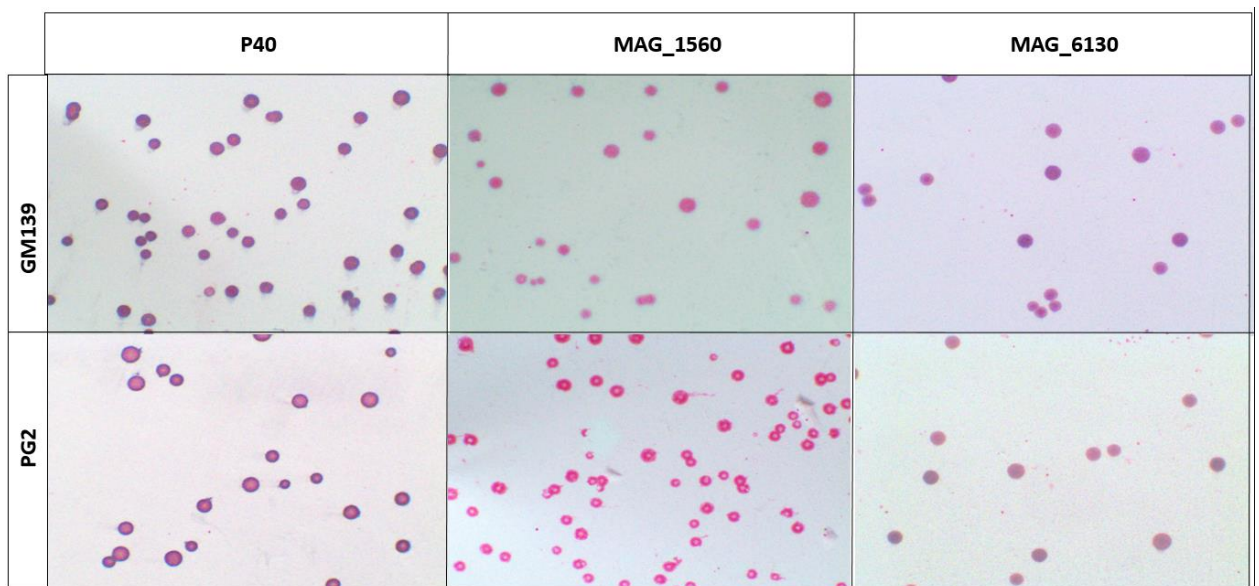
Legenda: (A) Perfil eletroforético de *M. agalactiae*, corado com *Comassie blue*, e suas frações proteicas derivadas após extração com Triton X-114. (B, C, D) Análise de *Western blot* demonstrando reconhecimento de proteínas da membrana por anticorpos anti-proteína recombinante (soro pré e hiperímune) em concentrações de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - P40 (B); $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - MAG_1560 (C); e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para MAG_6130 (D). PM: Padrão de peso molecular de proteína pré-corado Novex® Sharp. Coluna 1: Proteínas citosólicas e Coluna 2: lipoproteínas de *M. agalactiae* após extração por Triton X-114; 3. Proteínas totais de *M. agalactiae* GM139.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Blotting de colônias de *Mycoplasma agalactiae*

Blotting das colônias de *M. agalactiae* usando os soros pré e hiperimunes evidenciou a expressão das proteínas P40 e MAG_6130 nas colônias de maneira intensa e uniforme, sugerindo que essas proteínas não estão envolvidas no processo de variação de fase proteica. O anticorpo específico para a proteína MAG_1560, contudo, reagiu fracamente e de maneira similar ao soro pré imune, sugerindo, portanto, que essa proteína não tem expressão ou há expressão em baixos níveis nas condições avaliadas (Figura 11).

Figura 11 - *Colony blotting* de colônias de *Mycoplasma agalactiae* transferidas para membrana de nitrocelulose e reconhecidas por anticorpos específicos



Legenda: A cor púrpura é uma coloração específica da reação antígeno-anticorpo e indica a expressão de proteínas na superfície das bactérias nas linhagens GM139 (superior) e PG2 (abaixo). Concentrações do anticorpo primário $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (anti-P40), $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MAG_1560) e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (anti-MAG_6130), respectivamente. Imagens obtidas de estereomicroscópio Nikon SMZ-U.

Fonte: Elaborada pela autora.

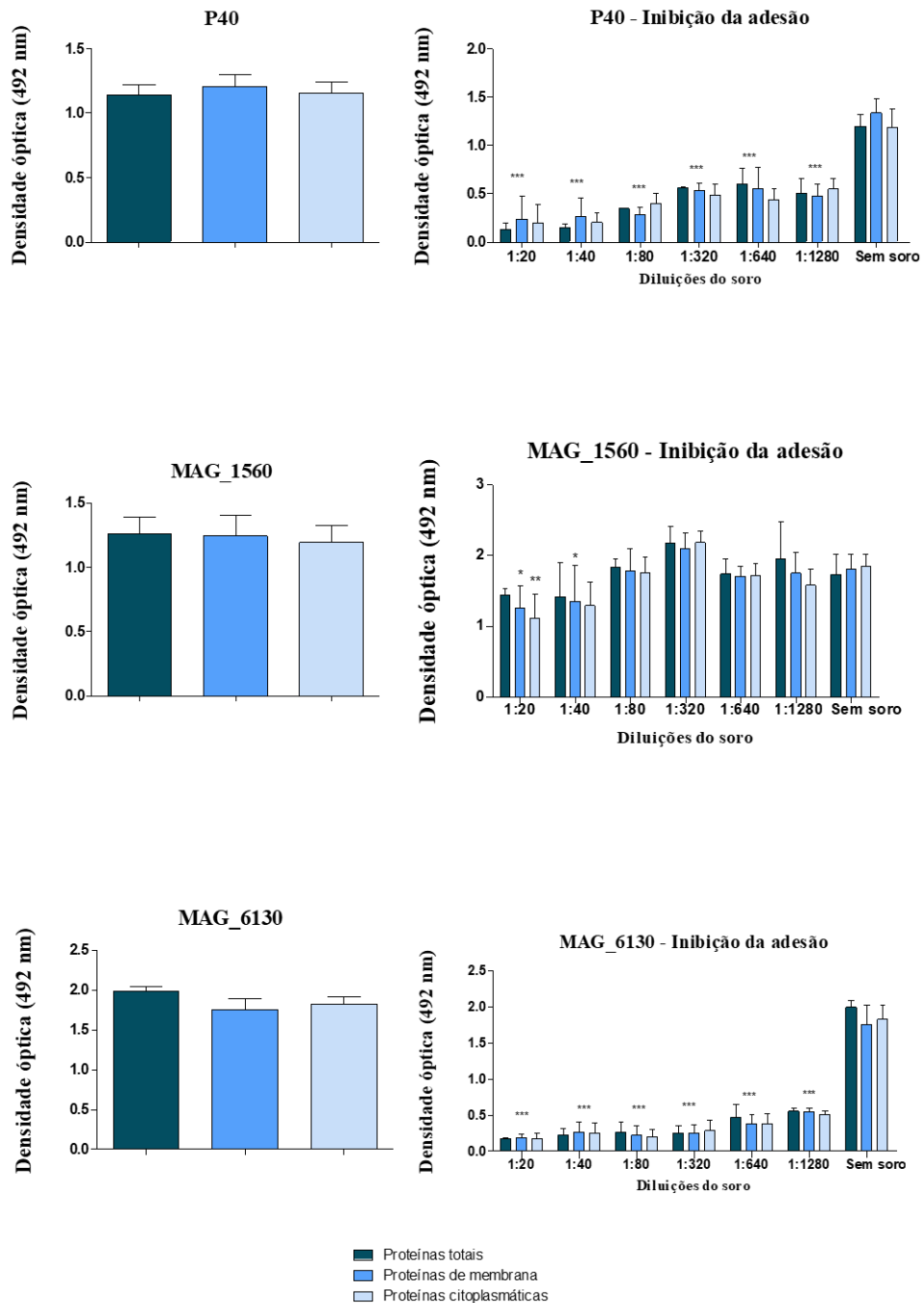
5.3 Avaliação das proteínas como adesinas microbianas

5.3.1 Adesão de proteínas recombinantes de *M. agalactiae* à frações celulares de HeLa e MSC

A adesão das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 à frações celulares de HeLa e MSC foram analisadas por ELISA (Figuras 12 e 13, respectivamente). As frações celulares de HeLa e MSC foram incubadas com as proteínas recombinantes de *M. agalactiae* e foi evidenciado o potencial de adesão entre as proteínas recombinantes e às frações celulares. O efeito inibitório dos soros anti-P40, anti-MAG_1560 e anti-MAG_6130 foi também avaliado. Nas frações celulares de HeLa, efeito inibitório da adesão entre proteínas

recombinantes foi evidenciado pelos soros anti-P40 e anti-MAG_6130 nas diluições utilizadas, enquanto a adesão da proteína MAG_1560 foi inibida em baixas diluições do soro. O efeito inibitório da adesão em MSC foi evidenciado ao pré-incubar todas as proteínas recombinantes com o respectivo anti-soro, mesmo em baixas concentrações (diluição 1:1280).

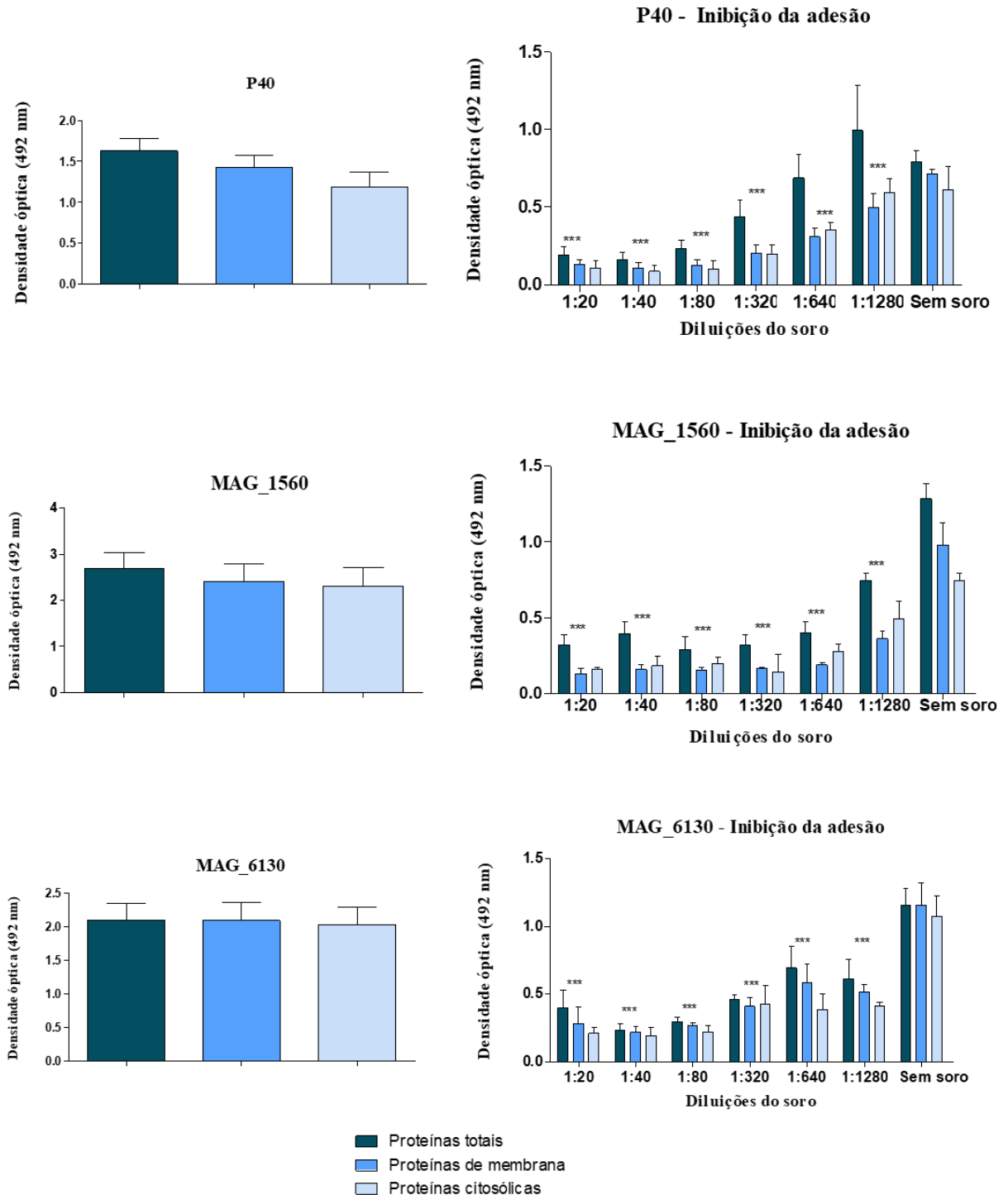
Figura 12 - Ensaio de adesão e inibição de adesão das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 à células HeLa por meio da metodologia de imunoenensaio



Legenda: Gráficos à esquerda correspondem a adesão das proteínas recombinantes à proteínas totais ou frações celulares de HeLa. Gráficos à direita correspondem a inibição da adesão das proteínas recombinantes à proteínas totais ou frações celulares de HeLa inibida por diluições (1:20 a 1: 1280) de anti-soro para cada proteína. BSA foi usado como controle negativo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ representam diferença estatisticamente significativa. *One way ANOVA* com pós teste de Dunnett.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Ensaios de adesão e inibição de adesão das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 à células MSC por meio da metodologia de imunoenensaio



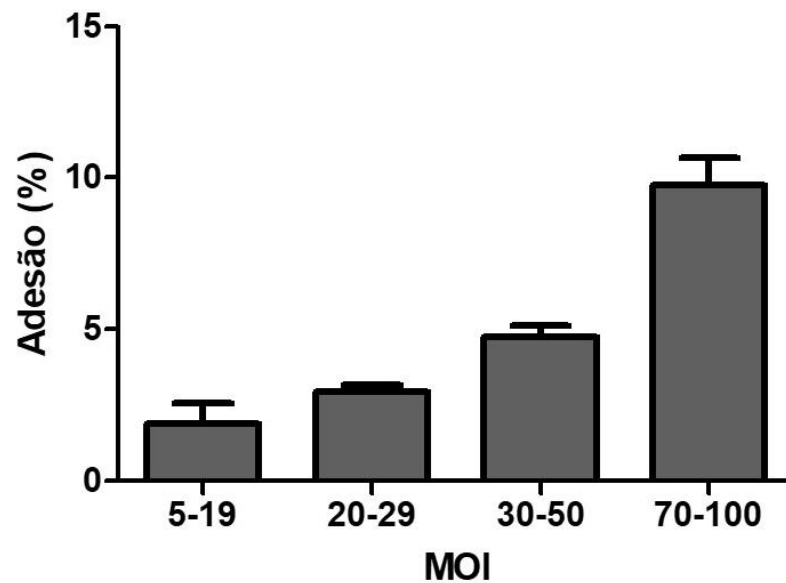
Legenda: Gráficos à esquerda correspondem a adesão das proteínas recombinantes à proteínas totais ou frações celulares de MSC. Gráficos à direita correspondem à inibição da adesão das proteínas recombinantes e proteínas totais ou frações celulares de MSC inibida por diluições (1:20 a 1: 1280) de anti-soro para cada proteína. BSA foi usado como controle negativo. (***) $p < 0,001$ representam diferença estatisticamente significativa. *One way ANOVA* com pós teste de Dunnet.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Adesão de *Mycoplasma agalactiae* em culturas celulares de HeLa e MSC

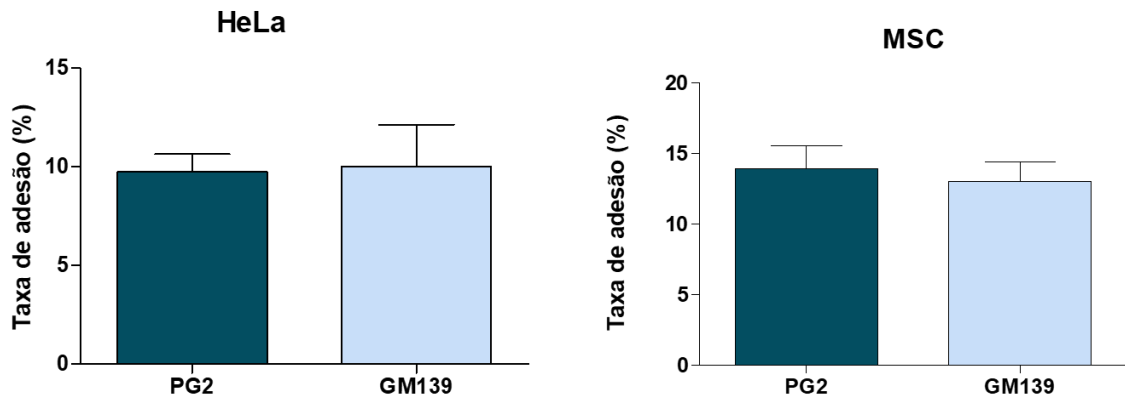
A figura 14 apresenta a adesão de *M. agalactiae* PG2 em diferentes MOI (entre 5 e 100) em células HeLa, sendo que a MOI que possuiu maior taxa de adesão foi entre 70 e 100. A figura 15 apresenta a adesão de *M. agalactiae* PG2 e GM139 às células HeLa e MSC após 4h de infecção (MOI 100). Observou-se taxa de adesão semelhante e prosseguiu-se com os ensaios de inibição da adesão em HeLa com a estirpe PG2, o qual está apresentado na figura 16. Verificou-se inibição da adesão de PG2 com anticorpos anti-P40 e anti-MAG_6130. Não houve inibição da adesão de PG2 com anticorpos anti-MAG_1560. Esses resultados foram semelhantes aos observados com os ensaios de inibição da adesão avaliados por imunossaios em células HeLa.

Figura 14 - Adesão de *Mycoplasma agalactiae* PG2 em células HeLa



Legenda: Taxa de adesão de *M. agalactiae* PG2 após 4 horas de infecção à células HeLa (MOI 5-100). Dados representados com a média (\pm DP) de três experimentos independentes realizados em duplicata.
Fonte: Elaborada pela autora.

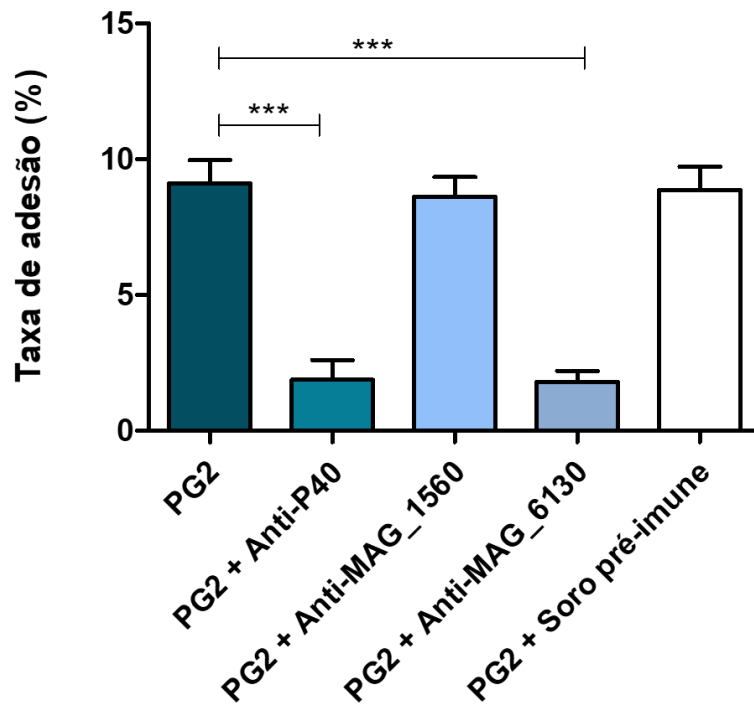
Figura 15 - Adesão de *Mycoplasma agalactiae* PG2 e GM139 em células HeLa e MSC



Legenda: Taxa de adesão de *M. agalactiae* PG2 após 4 horas de infecção à células HeLa e MSC (MOI 100). Dados representados com a média (\pm DP) de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - Inibição da adesão de *Mycoplasma agalactiae* PG2 em células HeLa



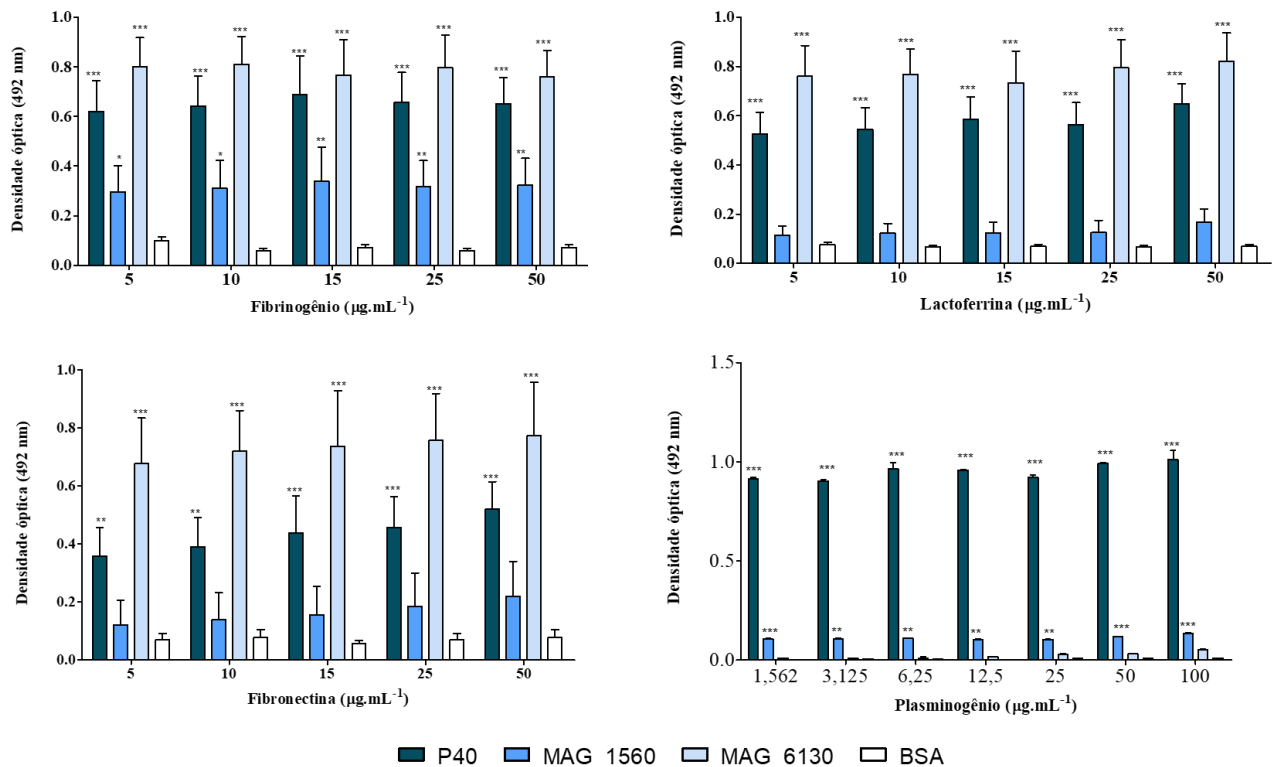
Legenda: Taxa de adesão de *Mycoplasma agalactiae* pré-incubado com anticorpos específicos contra as proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130. Dados da taxa de adesão estão representados com a média (\pm DP) de três experimentos independentes realizados em duplicata. (***) $p < 0,001$ representam diferença estatisticamente significativa calculados pelo teste *t de Student*.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Análise da interação ao plasminogênio, lactoferrina e componentes da matriz extracelular

Na Figura 17 estão apresentadas as intensidades da ligação das proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130 ao plasminogênio, fibrinogênio, fibronectina e lactoferrina, obtidas pela densidade óptica. A ligação entre P40 e plasminogênio não indicou ser dose dependente mesmo em baixas concentrações. Por outro lado, as proteínas MAG_1560 e MAG_6130 não demonstram ligação suficiente ao plasminogênio mesmo em altas concentrações (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Verifica-se que P40 liga-se também à fibronectina, lactoferrina e fibrinogênio e a proteína MAG_1560 liga-se apenas ao fibrinogênio. A proteína MAG_6130, liga-se à fibronectina, lactoferrina e fibrinogênio. Não houve interação entre as proteínas e BSA.

Figura 17 - Interação das proteínas de membrana recombinantes P40, MAG_1560, MAG_6130 de *Mycoplasma agalactiae* à diferentes moléculas do hospedeiro



Legenda: Ligação entre as proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *M. agalactiae* e diferentes quantidades de plasminogênio (100,0 – 1,562 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), fibronectina, fibrinogênio e lactoferrina (5 – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Dados representados com a média (\pm DP). (***) $p < 0,001$ (**) $p < 0,01$ (*) $p < 0,05$. Two way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborada pela autora.

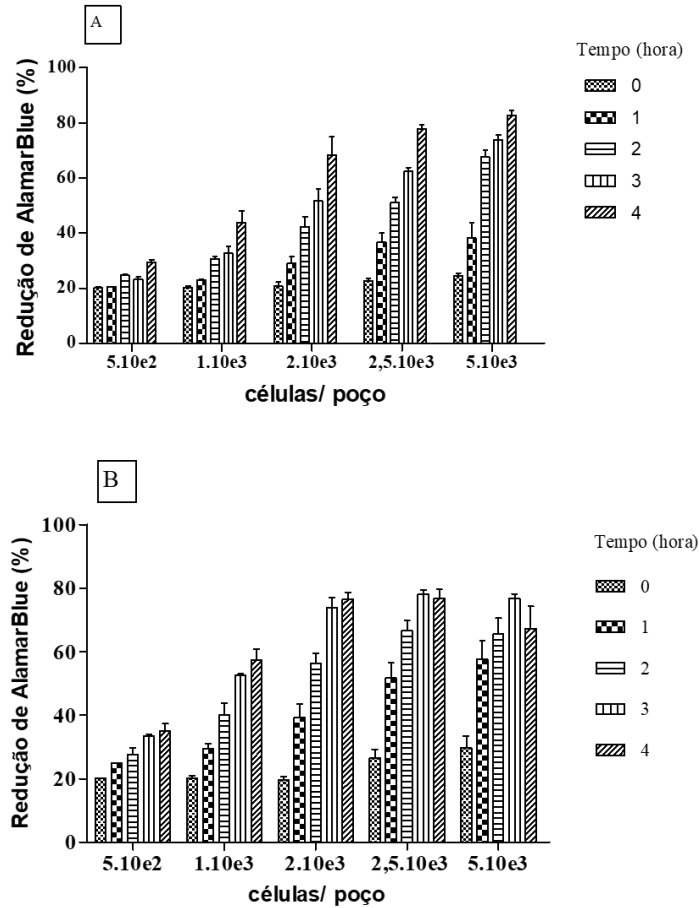
5.5 Avaliação do potencial citotóxico das proteínas recombinantes em células HeLa e MSC

5.5.1 Ensaio de viabilidade celular

Inicialmente determinou-se o tempo ideal de incubação e a densidade do plaqueamento celular. Os resultados das Figuras 18 e 19 permitiu selecionar a densidade de células de 2×10^3 células/ poço para células HeLa e 1×10^4 células/ poço para células MSC após 48h de incubação a 37°C e 5% de CO_2 por ter produzido uma reação dentro da faixa linear para esse período de incubação.

Em HeLa (Figura 20) e MSC (Figura 21), redução significativa na proliferação/ viabilidade celular foi observada quando essas células foram tratadas com P40, MAG_1560 e MAG_6130 na concentração de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ comparada ao controle negativo (células não tratadas). Essas evidências indicam que essas proteínas podem estar inibindo a proliferação celular, promovendo parada do ciclo celular, causando citotoxicidade e/ou ocasionando a morte celular quando células eucarióticas são infectadas por *M. agalactiae*, embora outros testes devem ser realizados para confirmar o papel dessas lipoproteínas em um processo de apoptose.

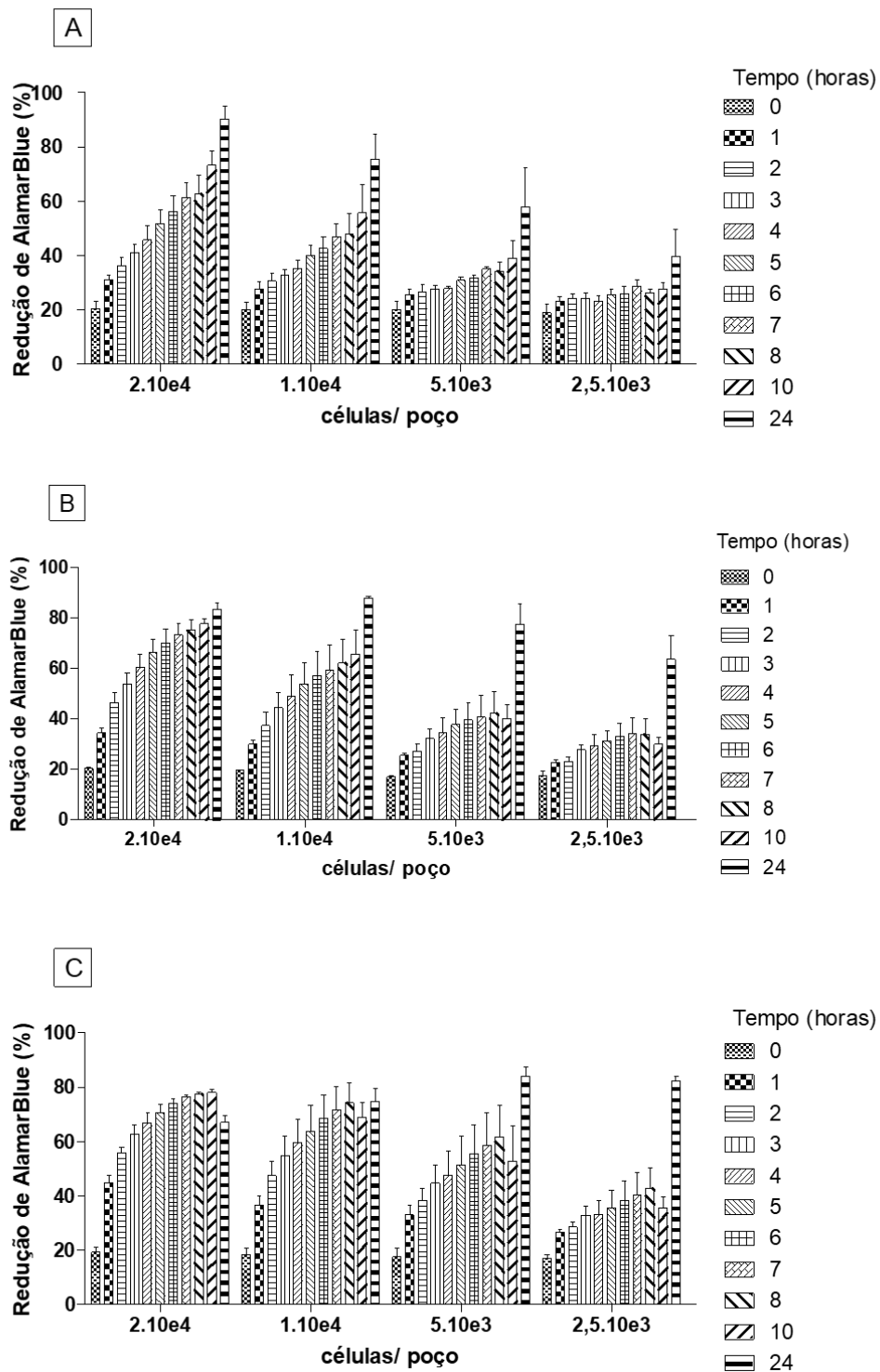
Figura 18 - Ensaio de viabilidade celular em diferentes concentrações de células HeLa e horas de incubação



Legenda: Diferentes concentrações de células por poço foram semeadas e incubadas por 24h (A) e 48h (B) a 37 °C, 5% de CO₂. O reagente alamarBlue™ (10µL/ poço) foi adicionado e a redução do reagente foi avaliada em 570 nm e 600 nm para determinar o tempo ideal de incubação e a densidade de plaqueamento celular.

Fonte: Elaborada pela autora.

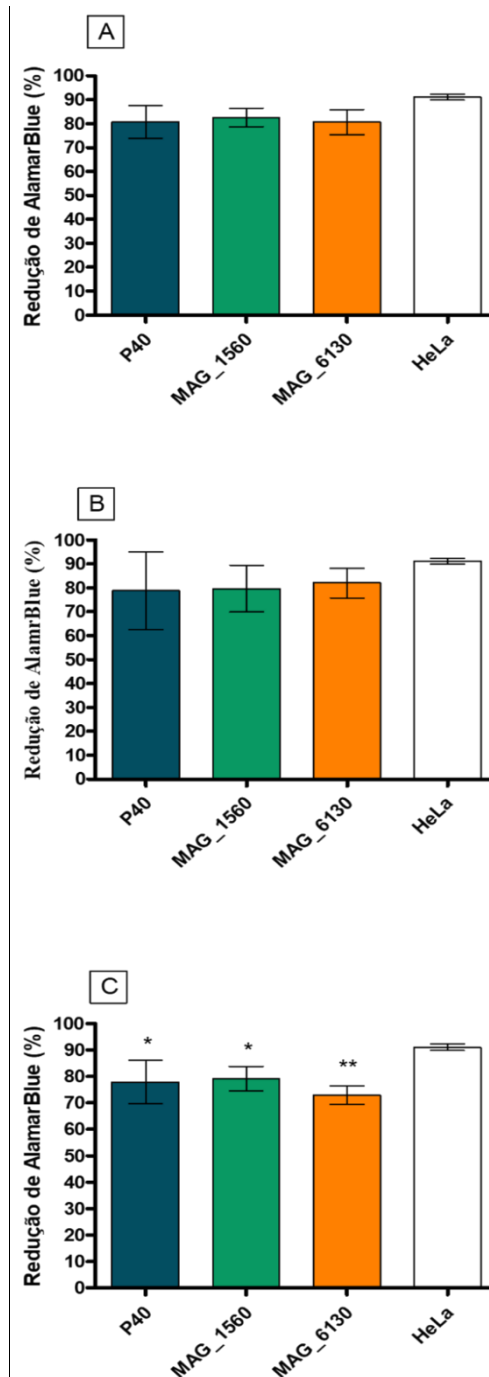
Figura 19 - Ensaio de viabilidade celular em diferentes concentrações de células MSC e horas de incubação



Legenda: Diferentes concentrações de células por poço foram semeadas e incubadas por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) a 37 °C, 5% de CO₂. O reagente alamarBlue™ (10µL/ poço) foi adicionado e a redução do reagente foi avaliada em 570 nm e 600 nm para determinar o tempo ideal de incubação e a densidade de plaqueamento celular.

Fonte: Elaborada pela autora.

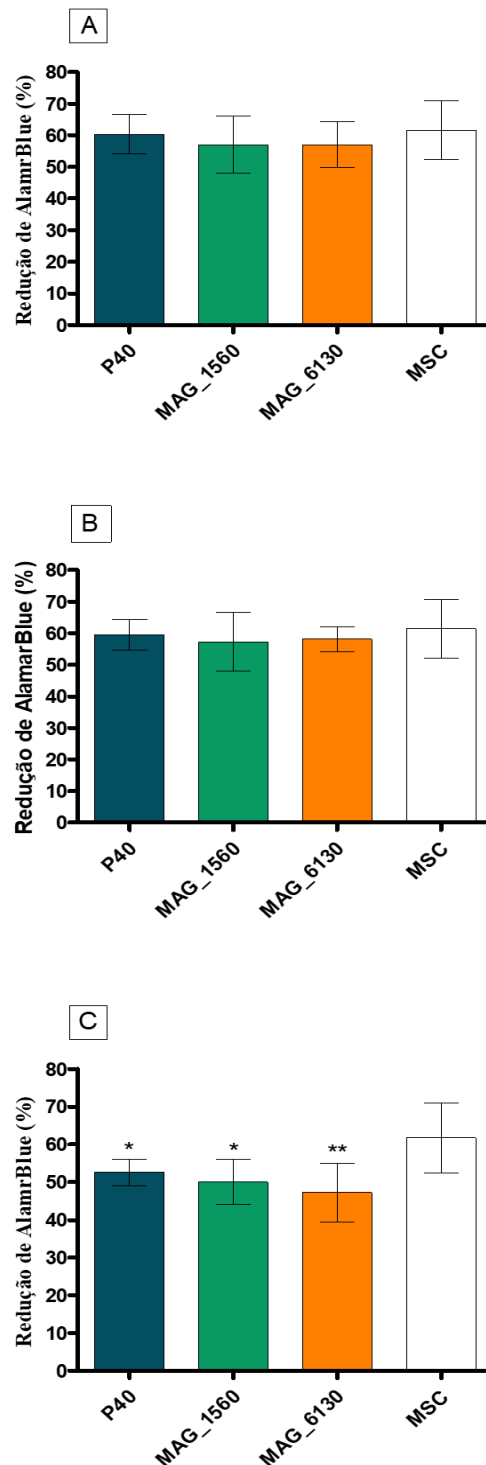
Figura 20 - Ensaio de viabilidade celular após incubação das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *Mycoplasma agalactiae* em células HeLa



Legenda: As células foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^3 células/ poço) e, após incubação por 18h, foram incubadas com as proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 [$1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (A), $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B) e $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C)] em triplicata. Após 48 horas de incubação com as proteínas foi acrescentado o reagente alamarBlue™ e sua redução foi avaliada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm, após 4 horas de incubação com o reagente. Células HeLa sem o estímulo foram utilizadas como controle negativo. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ representam diferença estatisticamente significativa calculados pelo teste *t de Student*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Ensaio de viabilidade celular após incubação das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 de *Mycoplasma agalactiae* em células MSC



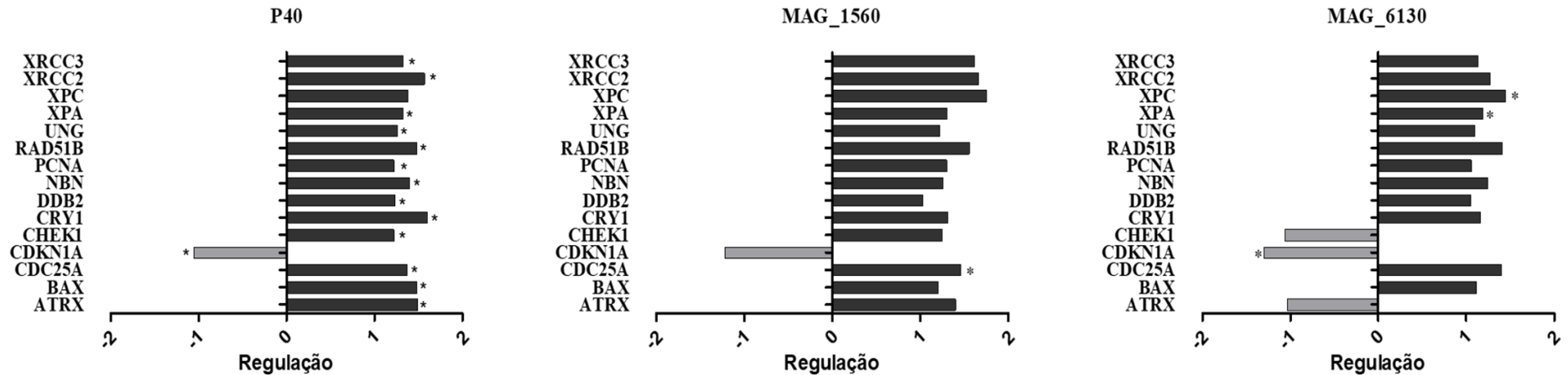
Legenda: MSC foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^4 células/poço) e, após incubação por 18h, foram incubadas com as proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 [$1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (A), $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B) e $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C)] em triplicata. Após 48 horas de incubação com as proteínas foi acrescentado o reagente alamarBlue™ e sua redução foi avaliada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm, após 4 horas de incubação com o reagente. Células MSC sem o estímulo foram utilizadas como controle negativo. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ representam diferença estatisticamente significativa calculados pelo teste *t de Student*.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.5.2 Análise da expressão gênica da via de dano ao DNA

A expressão dos genes da via de sinalização de danos ao DNA foi avaliada em células após exposição às proteínas P40, MAG_1560, MAG_6130 (Figura 22) ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Entre os genes analisados, 13 genes foram regulados positivamente em células inoculadas com P40 em comparação com o controle (células não estimuladas) (ATRX, BAX, CDC25A, CHEK1, CRY1, DDB2, NBN, PCNA, RAD51B, UNG, XPA, XRCC2, XRCC3; $p < 0,05$). Comparando a expressão gênica em células incubadas com MAG_1560 e grupo controle, apenas um gene foi regulado positivamente (CDC25A; $p < 0,05$). Comparando a expressão gênica em células estimuladas com MAG_6130 e grupo controle, dois genes foram regulados positivamente (XPA e XPC; $p < 0,05$) e apenas um gene foi regulado negativamente CDKN1A ($p < 0,05$).

Figura 22 - Análise de expressão gênica: Genes regulados positivamente e regulados negativamente



Legenda: Perfil de expressão gênica de células HeLa estimuladas com proteínas recombinantes de *M. agalactiae* (P40, MAG_1560 e MAG_6130) por 48 horas em comparação ao grupo controle (não estimuladas). P40, houve diferenças estatísticas entre os grupos em 13 genes regulados positivamente (ATRX, BAX, CDC25A, CHEK1, CRY1, DDB2, NBN, PCNA, RAD51B, UNG, XPA, XRCC2, XRCC3; $p < 0,05$). MAG_1560, houve diferença estatística em apenas um gene regulado positivamente (CDC25A; $p < 0,05$). MAG_6130, houve diferenças estatísticas em dois genes regulados positivamente (XPA e XPC; $p < 0,05$) e apenas um gene regulado negativamente (CDKN1A; $p < 0,05$). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados representam a média dos valores. * Significância estatística ($p < 0,05$) (teste *T de Student*, $2^{\Delta\Delta Ct}$) para cada gene no grupo controle e nos grupos de tratamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Micoplasmas possuem várias proteínas de membrana associadas aos lipídios, denominadas lipoproteínas. Ao contrário das bactérias com parede celular, que possuem um número menor dessas moléculas. Em geral, dois terços da massa da membrana dos micoplasmas correspondem a lipoproteínas (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; YOU; ZENG; WU, 2006). Essas moléculas expostas à superfície bacteriana podem ter as mesmas funções que as proteínas periplasmáticas em bactérias Gram-negativas (BROWNING et al., 2011) e geralmente medeiam a adesão (VENGADESAN; NARAYANA, 2011).

A partir das análises do *blotting* de colônias, observa-se que as proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130, não possuem alta frequência de variação antigênica, embora a P40 esteja envolvida em um evento de duplicação de genes (BARBOSA et al., 2020), tornando essas proteínas boas candidatas para o desenvolvimento de testes de diagnósticos. Fleury et al. (2002) confirmaram que P40 de *M. agalactiae* está localizado na sua superfície e expresso na maioria dos sorotipos, exceto o sorotipo C, que compreende 3,6% dos isolados (Bergonier et al., 1996). De forma semelhante, nesse estudo demonstrou a localização subcelular de MAG_1560 e MAG_6130 na membrana citoplasmática do micro-organismo. Contudo, MAG_1560 é expressa em níveis mais baixos ou talvez apenas em algum ponto da fase de crescimento do micro-organismo, *in vitro*.

Em *M. agalactiae*, até o momento, foi descrito apenas uma família multigênica envolvida em rearranjos de DNA de alta frequência, denominado de *locus vpma* (GLEW et al., 2000b) ou *avg* (FLITMAN-TENE et al., 2000). As proteínas de superfície Vpma podem estar envolvidas com evasão do sistema imune durante a infecção e influenciar a sobrevivência e persistência do micro-organismo no hospedeiro e dessa forma, facilitar a infecção crônica (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2012). Durante a infecção a expressão de VpmaY demonstrou ser dominante em fases iniciais de infecções via conjuntiva ocular e por via intramamária, evidenciando um potencial de infecção diferencial entre as Vpma (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2017). Além disso, Vpmas também demonstraram ter importante função na patogênese de *M. agalactiae*, uma vez que foi identificado a relação dessas moléculas na adesão e invasão do micro-organismo em células HeLa e células mamárias epiteliais e estromais de ovelhas, destacando-se principalmente VpmaV (HEGDE et al., 2018).

Similarmente, em *M. bovis* (estirpe PG45), também foi identificada uma família de lipoproteínas de superfície variáveis em tamanho e fase, denominadas Vsp, codificadas por 13 genes de cópias únicas apresentando alta frequência de variação de fase e tamanho independentes ancoradas na membrana plasmática pelo domínio N-terminal e com regiões de epítomos compartilhados (BÜRKI; FREY; PILO, 2015). Além disso, Vsp também possui regiões imunogênicas e sítios relacionados a adesão de *M. bovis* à células de pulmão bovino pelo menos nas VspA, VspB, VspE e VspF (SACHSE et al., 2000). *M. hyorhinae*, um patógeno suíno e associado a câncer gástrico em humanos possui sete proteínas de superfície variáveis (Vlp) as quais estão relacionadas a adesão em células epiteliais da traqueia e renais de suínos, principalmente VlpD e VlpF (XIONG et al., 2016a). Além de Vlp em *M. hyorhinae* auxiliar na evasão do sistema imune durante a infecção *in vivo*, Vlp podem ter também função na adesão à células de outras espécies, pois esse micro-organismo também é um frequente contaminante de culturas de células (XIONG et al., 2016a). A família de lipoproteínas de superfície pMGA de *M. gallisepticum* apresenta 33 membros na estirpe S6, 70 na estirpe R e alta variação de fase *in vivo*, diminui sua expressão após dois dias da infecção e é expressa novamente, seis dias após infecção, na maioria das colônias. As lipoproteínas pMGA demonstraram um fenótipo reversível e intercalável entre o fenótipo pMGA1.1 e pMGA1.2, fornecendo uma vantagem seletiva na colonização nos estágios iniciais da infecção na colonização traqueal (GLEW et al., 2000a). A rápida e reversível mudança na expressão do gene codificador da proteína pMGA é regulada pelo trinucleotídeo (GAA)₁₂ presente em pMGA1.9 e pMGA1.2 (GLEW et al., 1998). Outras proteínas de superfície variáveis tem sido identificadas em micoplasmas, como as Vmm e Vmm-type em *M. mycoides* (agente causador da Pleuropneumonia contagiosa bovina) (HAMSTEN et al., 2008); e nos micoplasmas humanos: P35 em *M. penetrans* (FERRIS et al., 1999) e Vaa em *M. hominis* (BOESEN et al., 1998).

A citoaderência em micoplasmas é essencial para a colonização e infecção, e é o principal fator de virulência. Essas bactérias têm vias metabólicas incompletas e usam a adesão às células do hospedeiro para obter nutrientes (ROTTEM, 2003). As adesinas mais bem caracterizadas em micoplasmas são as de micoplasmas humanos, *M. pneumoniae* e *M. genitalium*, e o patógeno de aves, *M. gallisepticum*. Esses micro-organismos possuem uma “organela de adesão” que consiste em uma estrutura terminal com um filamento central, formada por diversas adesinas (WAITES; TALKINGTON, 2004). Outros micoplasmas não possuem estrutura específica para adesão e ainda apresentam citoaderência mediada por lipoproteínas. Ensaio de imunofluorescência demonstrou que as subunidades α e β da piruvato

desidrogenase de *M. gallisepticum* é aderente à fibroblastos de galinha (DF-1) e a aderência foi inibida por antisoro específicos contra PDHA e PDHB (QI et al., 2018). Por imunofluorescência, foi observado que anticorpos contra frutose-1,6-bisfosfato aldolase de *M. bovis* inibiram a aderência de *M. bovis* à células de pulmão bovino (EBL), em ensaio de adesão em monocamada, apresentando taxa de inibição da aderência de 34,4% (GAO et al., 2018). Em *M. pneumoniae*, o fator de alongamento Tu adere à células A594 e essa aderência é inibida por anticorpos contra esse fator de alongamento em imunoenaios (WIDJAJA et al., 2017). Duas outras moléculas de *M. pneumoniae*, GroEL e DnaK, também foram descritas como adesinas à A549, por imunoenaios em microplacas e imunofluorescência, além disso enquanto em GroEL valores de adesão são mais altos tanto na fração citosólica quanto às proteínas associadas a membrana de A594, DnaK, se aderiu a ambas frações, porém em maior quantidade à fração contendo proteínas citosólicas (HAGEMANN et al., 2017). Em *M. hyopneumoniae* foi demonstrado em ensaios em microplacas que P146 possui dois fragmentos de adesão ao epitélio cíliado de suínos, o fragmento F1_{P146/232} e o fragmento F3_{P146/232} (BOGEMA et al., 2012). Diferentes fragmentos da proteína Mhp107 de *M. hyopneumoniae* também demonstrou aderência à células epiteliais de rim de porcos (células PK15) (F3_{Mhp107}) e à cílios respiratórios de suínos (F1_{Mhp107}, F2_{Mhp107} e F3_{Mhp107}) (SEYMOUR et al., 2011). Outra proteína, também de *M. hyopneumoniae* demonstrou aderência à células PK15 e à cílios respiratórios de suínos por imunoenaios em microplacas em diferentes regiões (SEYMOUR et al., 2010). Especificamente sobre *M. agalactiae*, apenas P40 (FLEURY et al., 2002), piruvato desidrogenase (HEGDE; ROSENGARTEN; CHOPRA-DEWASTHALY, 2015) e Vpmas (HEGDE et al., 2018) foram descritas como adesinas e/ ou invasinas até o momento. P40 demonstrou aderência previamente em células sinoviais de articulações de cordeiro em ensaios de inibição de adesão, contudo, maiores taxas de inibição de adesão foram observadas ao usar apenas a porção Fab de anticorpos específicos contra P40 (38,7%) quando comparado com anticorpos totais (85,7%) (FLEURY et al., 2002)

Ensaio com *M. agalactiae* mutantes para a subunidade B de piruvato desidrogenase ($\Delta pdhB$) demonstraram menor invasividade em HeLa quando comparados com a estirpe selvagem (PG2) e complementar ($\Delta pdhB::pPpdhAblacZ$) (HEGDE; ROSENGARTEN; CHOPRA-DEWASTHALY, 2015). Em ensaios de adesão *in vitro* com PG2 mutantes expressando uma única Vpma (VpmaU, VpmaV, VpmaW, VpmaX, VpmaY ou VpmaZ) em HeLa, células mamárias epiteliais (MEC) e estromais (MSC) de ovelhas demonstraram que apenas VpmaU possuiu características de adesinas ao comparar a adesão da estirpe expressando

apenas VpmaU com a estirpe PG2 selvagem, entretanto, todas Vpmas possuíram a taxa de adesão significativamente reduzidas em ensaios de inibição da adesão com anticorpos específicos contra cada Vpma, comparadas com as estipes na ausência de anticorpos. Vpmas também demonstraram potencial de invasividade, principalmente VpmaV, embora não tenha sido estatisticamente significativa quando comparada com PG2. Estirpe expressando apenas VpmaU foi a menos invasiva (estatisticamente significativa) entre todas as outras Vpmas quando comparada à estirpe selvagem (HEGDE et al., 2018). VpmaV compartilha epítomos com a adesina Vsp de *M. bovis* e esses epítomos podem também ser os responsáveis pela adesão de VpmaV, embora essa afirmação ainda necessita validação experimental (HEGDE et al., 2018).

Ensaio de adesão bacteriana demonstraram que, em *M. agalactiae*, PG2 e GM139 aderem às células eucarióticas de maneira semelhante, tanto em HeLa quanto em células estromais primárias de ovelha (MSC), embora a taxa de adesão observada neste estudo (entre 10-15%) tenha sido menor do que a taxa de adesão observada em estudos anteriores usando o mesmo protocolo e células (HEGDE et al., 2015a, 2018). Como utilizada nesse trabalho, MOI 100 (ou maior) é bastante comum em estudos de interação micoplasma-célula, por exemplo, em *Ureaplasma diversum* (MOI de 100) (MARQUES et al., 2016) e *M. synoviae* (2009) (DUŠANIĆ et al., 2009). MOI maiores que 100 também foram usados em ensaios de adesão entre outros micoplasmas e células hospedeiras, por exemplo, MOI 200 para *M. gallisepticum*. (QI et al., 2018), MOI 1000 (GUO et al., 2017), MOI 500 (CHEN et al., 2018) e MOI 200 (GAO et al., 2018) para *M. bovis*, assim como MOI 200 para *M. synoviae* (BAO et al., 2014).

Ao avaliar a capacidade específica dos anticorpos anti-P40, anti-MAG_1560 e anti-MAG_6130 em inibir a ligação de *M. agalactiae* à célula, observou-se que a proteína MAG_6130 possui capacidade de adesão semelhante da citoadesina P40, descrita por Fleury et al., (2002). Os resultados foram semelhantes por diferentes métodos: inibição da adesão realizada com frações celulares em imunoenaios e em células em monocamadas de HeLa e MSC. Por outro lado, a adesão de MAG_1560 mostrou ser inibida apenas em ensaios de adesão usando frações celulares de MSC e HeLa (em altas concentrações), mas não em células em monocamadas. A expressão de MAG_1560 nesta situação pode estar sendo regulada por fatores ambientais ou por interferência entre adesinas. As bactérias que expressam adesinas múltiplas variam seu perfil de adesão por meio da expressão controlada de adesinas em diferentes estágios durante a infecção (KLEMM; SCHEMBRI, 2000).

Além da citoaderência inicial, as adesinas requerem uma associação estável com outras moléculas biológicas, incluindo fibronectina, plasminogênio, heparina, fibrinogênio,

vitronectina (YIWEN et al., 2021). Os ensaios de ligação às proteínas do plasminogênio e da matriz extracelular identificaram que as proteínas de membrana de *M. agalactiae* avaliadas nesse estudo se ligam a essas moléculas de forma diferenciada entre elas e não dependente da concentração. P40 se liga ao plasminogênio, porém não foi avaliado se P40 é capaz de ativar plasminogênio à plasminina e se interações iônicas e o aminoácido lisina interfere nessa interação. P40 também se liga à fibronectina, lactoferrina e fibrinogênio. MAG_1560 se liga apenas ao fibrinogênio. E MAG_6130, liga-se à fibronectina, lactoferrina e fibrinogênio. A interação de MAG_6130 e P40 com lactoferrina sugere que essas moléculas podem estar envolvidas no metabolismo de ferro de *M. agalactiae* e possivelmente contribuindo na virulência. Em *M. pneumoniae*, é proposto que a aquisição de lactoferrina humana provoca lesão local, através da geração de radicais hidroxil reativos resultantes da introdução de complexos de ferro em um microambiente tornado localmente ácido pelo metabolismo celular que também inclui peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (WAITES; TALKINGTON, 2004).

As interações entre as proteínas do hospedeiro e outras proteínas de micoplasma têm sido descritas (SEYMOUR et al., 2012; BAO et al., 2014; GRÜNDEL et al., 2016b; GUO et al., 2017; HAGEMANN et al., 2017; ZHAO et al., 2017; GAO et al., 2018). GroEL e DnaK de *M. pneumoniae* demonstraram se ligar ao plasminogênio (0-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), vitronectina (0-1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), fibrinogênio (0-40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), fibronectina (0-80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), lactoferrina (0-1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e laminina (0-20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), além disso essas ligações foram alteradas pela força iônica pela adição de NaCl para a interação de GroEL e DnaK e plasminogênio, vitronectina, lactoferrina e laminina (HAGEMANN et al., 2017). Além dessas proteínas, proteínas glicolíticas (PdhA, PdhB, PdhC, GapA, Pgm, Pyk, Tkt e Ldh) de *M. pneumoniae* também apresentam ligação à diversas moléculas do hospedeiro [lactoferrina (0-2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), laminina (0-25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), vitronectina (0-2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), fibrinogênio (0-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e fibronectina (0-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)] (GRÜNDEL et al., 2016a). As proteínas FBA (HUANG et al., 2019), TrmFO (GUO et al., 2017) e P27 (CHEN et al., 2018) de *M. bovis* também tem sido demonstrada a se ligarem à fibronectina (0-50/100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O plasminogênio é imobilizado na superfície de algumas bactérias pela presença de receptores, que permitem sua conversão em plasmina e migração bacteriana por meio da barreira tecidual (GRÜNDEL et al., 2016b; HAGEMANN et al., 2017). Além disso, o plasminogênio ligado à superfície do patógeno pode contribuir para a degradação de C3b e C5, inibindo assim a ativação das três vias do sistema do complemento (BHATTACHARYA;

PLOPLIS; CASTELLINO, 2012; LAW; ABU-SSAYDEH; WHISSTOCK, 2013). Embora a proteína MAG_6130 não se ligue ao plasminogênio, ela interage com outras moléculas do hospedeiro (fibronectina, lactoferrina e fibrinogênio) podendo contribuir para a adesão do micoplasma à célula hospedeira. As interações entre proteínas bacterianas e fibronectina e fibrinogênio facilitam a fixação do micro-organismo à superfície da célula hospedeira via integrina, auxiliando na adesão, invasão e formação de biofilme bacteriano (STONES; KRACHLER, 2015; PICKERING et al., 2019). Além disso, a ligação da lactoferrina ao P40 e ao MAG_6130 pode auxiliar na aquisição de ferro para o crescimento e proteção bacteriana contra peptídeos antimicrobianos catiônicos, conforme descrito para outras bactérias (MORGENTHAU et al., 2013). Portanto, além de P40 e MAG_6130 estarem envolvidas na adesão à célula hospedeira, também podem estar envolvidos na evasão do sistema imunológico. Ainda, a ausência da inibição da adesão de MAG_1560 em monocamada de células HeLa pode também ser devido a falta de interação entre essa molécula e fibronectina, uma vez que fibronectina ou polissacarídeos sulfatados estão relacionadas à capacidade de adesão/invasão de bactérias ao hospedeiro (ROTTEM, 2003).

Em *M. pneumoniae* todas as subunidades da piruvato desidrogenase (PDHA-D) foram capazes não apenas se ligarem à células HeLa mas também ao plasminogênio humano de forma dose-dependente (GRÜNDEL et al., 2015). A ligação de PDHB e PDHD não foi alterada pela concentração de NaCl, ao contrário do que foi observado com PDHA e PDHC (GRÜNDEL et al., 2015). Com a adição do análogo de lisina, o ácido aminocaprílico, reduziu a ligação do plasminogênio à todas subunidades do piruvato desidrogenase, contudo, apenas PDHB ativou plasminogênio na presença de uPa e a plasmina convertida foi capaz de induzir a degradação de fibrinogênio humano (GRÜNDEL et al., 2015).

Proteínas de membrana de micoplasmas também interagem com outras proteínas da matriz extracelular que não foram avaliadas neste trabalho. GAPDH de *M. hyorhynis* além de interagir com fibronectina, também se liga à laminina, colágeno tipo IV e vitronectina de forma dose-dependente (WANG et al., 2021). Frações da proteína Mhp271 (*M. hyopyneumoniae*) mostraram uma ligação de alta afinidade à heparina e essa ligação é dependente do grau de sulfatação (DEUTSCHER et al., 2010). O fator de alongação Tu, nesse mesmo micro-organismo demonstrou interagir com plasminogênio, fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, lactoferrina e laminina de forma dose-dependente. Ainda, a ligação ao plasminogênio é dependente de interações iônicas (avaliado com concentrações crescentes de NaCl) e ácido

aminocapróico inibiu a interação entre plasminogênio e o fator de alongação Tu, destacando a multifuncionalidade dessa proteína *moonlighting* (WIDJAJA et al., 2017).

Apesar dos estudos de adesão entre micoplasmas e as células hospedeiras, pouco se sabe sobre a interação entre esses micro-organismos e receptores celulares. Foi demonstrado que *M. hyopneumoniae* se liga à β -actina extracelular de células epiteliais suínas de forma dose-dependente e essa adesão é mediada pela proteína P97 em pelo menos duas regiões distintas, caracterizando a actina como um receptor importante para *M. hyopneumoniae* no pulmão de suínos (RAYMOND et al., 2018). Outro estudo demonstrou que ambos, *M. gallisepticum* e a proteína MgPa se ligam a ciclofilina A na célula hospedeira, sendo um possível receptor para esse micro-organismo (DENG et al., 2018a). Além disso, MgPa também interage com outros três peptídeos (V-H-W-D-F-R-Q-W-W-Q-P-S), (D-W-S-S-W-V -Y-R-D-P-Q-T) e (H-Y-I-D-F-R-W), identificados por *Phage display*, que podem estar associados como receptores na adesão de células (DENG et al., 2018b). Ácido siálico atua como receptor de *M. pneumoniae*, especificamente, α -2,3- e α -2,6-sialilactose favorece a aderência do micro-organismo (WILLIAMS et al., 2018). Também, ácido siálico atua como receptor da adesina P110 de *M. gallisepticum*, caracterizada por interações com o tripeptídeo Ser456-Phe457-Ser458 e aos resíduos Pro197-Ser198-Pro199-Asn200, demonstrando ser o principal receptor na célula hospedeira durante a infecção (APARICIO et al., 2018). Ainda, glicoconjugados sialilados atuam como receptores na ligação de *M. mobile* à célula hospedeira por meio do domínio C-terminal da adesina Gli349 e essa interação está envolvida no mecanismo de deslizamento de *M. mobile* (HAMAGUCHI et al., 2019).

A adesão de micoplasmas às células hospedeiras pode levar a danos celulares (ROTTEM, 2003). Em *M. pneumoniae*, a ausência de fosforilação nas proteínas HMW1, HMW3, na adesina principal P1 e na proteína de superfície MPN474 não apenas altera a função da organela terminal, resultando em menor adesão, mas também atua na perda de citotoxicidade à células HeLa (SCHMIDL et al., 2010). Ao avaliar a citotoxicidade das proteínas recombinantes P40, MAG_1560 e MAG_6130 em células MSC e HeLa demonstrou-se que essas proteínas alteram a viabilidade / proliferação celular e podem contribuir para o processo de destruição celular em células infectadas com *M. agalactiae*. Estes resultados demonstraram uma citotoxicidade dependente da dose. Da mesma forma, proteínas de membrana em outros micoplasmas também demonstraram desempenhar um papel importante na destruição celular, como evidenciado pela proteína MhSPase I ao ser incubada com células suínas PK(15) em concentrações de 0,5 à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ onde o efeito citotóxico foi avaliado pelo ensaio de MTT e

ativação de caspase-3 (PAES et al., 2017). Além disso, lipoproteínas de *U. diversum* (0,5 à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) também induzem a expressão de IL-1 β , TNF- α , TLR2 e TLR4 em macrófagos e IL-1 β e TNF- α em blastocistos (SANTOS-JUNIOR et al., 2018). Contudo, mais estudos precisam ser realizados para avaliar se P40, MAG_1560 e MAG_6130 também estão envolvidas na viabilidade celular por meio da indução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6), NO e ROS.

Danos à célula hospedeira têm sido demonstrados em alguns micoplasmas patogênicos em animais (LIU; SHOU, 2011; AMORIM et al., 2014; BAI et al., 2015; HEGDE et al., 2016; XUE et al., 2017; LIU et al., 2020b; HU et al., 2021) e em humanos (SILWEDEL et al., 2019) com ativação de caspases, MAPK, ROS e a via de sinalização ERK (NI et al., 2015; LI et al., 2016). Especificamente, foi demonstrado que algumas proteínas presentes nestes microorganismos ativam genes pró-apoptóticos, como a nuclease MbovNase (ZHANG et al., 2016), proteína P48 (WU et al., 2021), MbovP280 (ZHAO et al., 2021) de *M. bovis*; Mhp597 e P68, de *M. hyopneumoniae* (LI et al., 2019; LIU et al., 2019) e GroEL, de *M. gallisepticum* (YU et al., 2019) por ativação de MAPK, BAK, caspases ou por via desconhecida. Ao contrário, Gaa de *M. gallisepticum*, além de ativar MAPK e NF- κ B via MAP3K1 e induzir TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, Gaa induz proliferação celular por aumento da progressão do ciclo celular e supressão da apoptose celular (ZHAO et al., 2019). Da mesma forma, neste estudo demonstramos o perfil de regulação positiva de genes em células estimuladas por proteínas de membrana de *M. agalactiae*, principalmente por P40. Contudo, não se pode afirmar qual via de sinalização de dano/ reparo ao DNA foi ativada. Evidências de eventos de apoptose foram observadas pelo aumento da expressão de ATRX (que atua na remodelação da cromatina e está relacionado à cascata de MAPK (LOVEJOY et al., 2012)) e aumento da expressão de BAX, que permite a liberação de citocromo c e outras moléculas por meio de canais na membrana mitocondrial, além de ativar caspase 9 e, em seguida a caspase 3 (KIM-CAMPBELL; GOMEZ; BAYIR, 2019). Aumento na expressão de moléculas que atuam em resposta à danos ao DNA foi também observado. Inicialmente, RAD51 é recrutado de forma dependente de ATM e NBN. NBN direciona MRE11A e RAD50 para o sítio de dano ao DNA, onde interage com a proteína ATM (STRACKER; PETRINI, 2011; YAN; SORRELL; BERMAN, 2014). RAD51 em complexo com XRCC3, promove a ativação de Chek2. O ATR também é ativado e fosforila Chek1, resultando na interrupção do ciclo celular. DDB2 também diminui a regulação de p21 por proteólise, permitindo a morte celular (STOYANOVA et al., 2009). Devido à gravidade do dano ao DNA pode ocorrer parada do ciclo celular, reparo do DNA, senescência ou apoptose

(CICCIA; ELLEDGE, 2010; SUWAKI; KLARE; TARSOUNAS, 2011; SULLIVAN; BERNSTEIN, 2018).

7 CONCLUSÃO

Apenas algumas proteínas de *M. agalactiae* têm sido funcionalmente caracterizadas até agora, incluindo P40 (FLEURY et al., 2002), PdhB (HEGDE; ROSENGARTEN; CHOPRA-DEWASTHALY, 2015), Vpmas (HEGDE et al., 2018) e MAG_5040 (CACCIOTTO et al., 2013). Este estudo comprovou resultados prévios de bioinformática (BARBOSA, 2016; BARBOSA et al., 2020) demonstrando que as proteínas P40, MAG_1560 e MAG_6130 estão localizadas na membrana citoplasmática de *M. agalactiae* e provavelmente não estão envolvidas em eventos de alta variação antigênica de superfície além de serem imunogênicas em coelhos. Ainda, P40 e MAG_6130 contribuem para a adesão celular do micro-organismo evidenciado *in vitro* por imunoenaios e em células em monocamada. Pela primeira vez, descrevemos em *M. agalactiae* três proteínas de membrana que interagem a pelo menos uma das moléculas do hospedeiro avaliadas (plasminogênio, fibronectina, lactoferrina e/ou fibrinogênio). Destaca-se também a interação de P40 e MAG_6130 à lactoferrina e o possível envolvimento dessas moléculas na captação e/ou metabolismo de ferro pela célula bacteriana. Além disso, mostramos que principalmente P40 pode alterar a proliferação ou a viabilidade de células HeLa e MSC devido à extensão aos danos ao DNA que necessita, posteriormente, ser confirmado com *Western blotting*. Dessa forma, P40, MAG_1560 e MAG_6130 podem contribuir para a colonização, evasão imunológica e estabelecimento da infecção por *M. agalactiae* no hospedeiro. Portanto, evitar a adesão microbiana ao inibir a ligação dessas proteínas de membrana aos receptores da célula hospedeira fortalece as evidências de que P40, MAG_1560 e MAG_6130 podem ser candidatos vacinais.

REFERÊNCIAS¹

- 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. 3833–45, set. 2011.
- 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.
- 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.
- 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. 1265–70, 15 abr. 2011.
- AMORIM, A. T.; MARQUES, L. M.; SANTOS, A. M. O. G.; MARTINS, H. B.; BARBOSA, M. S.; REZENDE, I. S.; ANDRADE, E. F.; CAMPOS, G. B.; LOBÃO, T. N.; CORTEZ, B. A.; MONEZI, T. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; TIMENETSKY, J. Apoptosis in HEp-2 cells infected with *Ureaplasma diversum*. **Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 38, 4 dez. 2014.
- ANDERSON, T. J. C.; ENABULELE, E. E. *Schistosoma mansoni*. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 176–177, fev. 2021.
- ANTUNES, N. T.; TAVÍO, M. M.; ASSUNÇÃO, P.; ROSALES, R. S.; POVEDA, C.; DE LA FÉ, C.; GIL, M. C.; POVEDA, J. B. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 3, p. 436–438, 2008.
- APARICIO, D.; TORRES-PUIG, S.; RATERA, M.; QUEROL, E.; PIÑOL, J.; PICH, O. Q.; FITA, I. *Mycoplasma genitalium* adhesin P110 binds sialic-acid human receptors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4471, 26 dez. 2018.
- 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.
- ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Molecular characterization of *Mycoplasma agalactiae* reveals the presence of an endemic clone in Spain.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Journal of clinical microbiology, v. 51, n. 2, p. 656–60, fev. 2013.

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.

BALASUBRAMANIAN, S.; KANNAN, T. R.; BASEMAN, J. B. The Surface-Exposed Carboxyl Region of *Mycoplasma pneumoniae* Elongation Factor Tu Interacts with Fibronectin. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 76, n. 7, p. 3116–3123, 2008.

BALISH, M. F. Subcellular structures of mycoplasmas. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 2017–2027, 2006.

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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, p. 1255–1258, 2008.

BAO, S.; GUO, X.; YU, S.; DING, J.; TAN, L.; ZHANG, F.; SUN, Y.; QIU, X.; CHEN, G.; DING, C. *Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 223, 25 dez. 2014.

BARBOSA, M. S. **Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae***. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

BARBOSA, M. S.; ALVES, R. P. dos S.; REZENDE, I. de S.; PEREIRA, S. S.; CAMPOS, G. B.; FREITAS, L. M.; CHOPRA-DEWASTHALY, R.; FERREIRA, L. C. de S.; GUIMARÃES, A. M. de S.; MARQUES, L. M.; TIMENETSKY, J. Novel antigenic proteins of *Mycoplasma agalactiae* as potential vaccine and serodiagnostic candidates. **Veterinary Microbiology**, v. 251, 1 dez. 2020.

BARBOZA, M.; PINZON, J.; WICKRAMASINGHE, S.; FROEHLICH, J. W.; MOELLER, I.; SMILOWITZ, J. T.; RUHAAK, L. R.; HUANG, J.; LÖNNERDAL, B.; GERMAN, J. B.; MEDRANO, J. F.; WEIMER, B. C.; LEBRILLA, C. B. Glycosylation of human milk lactoferrin exhibits dynamic changes during early lactation enhancing its role in pathogenic bacteria-host interactions. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 11, n. 6, p. 1–10, 2012.

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.

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.

BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 4: Bacteroidetes**. [s.l.: s.n.]

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: Current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz**, 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.
- BERTOLINI, S.; MAURELLA, C.; BONA, C.; INGRAVALLE, F.; DESIATO, R.; BAIONI, E.; CHIAVACCI, L.; CARAMELLI, M.; RU, G. A relevant long-term impact of the circulation of a potentially contaminated vaccine on the distribution of scrapie in Italy. Results from a retrospective cohort study. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 63, jan. 2012.
- BHATTACHARYA, S.; PLOPLIS, V. A.; CASTELLINO, F. J. Bacterial Plasminogen Receptors Utilize Host Plasminogen System for Effective Invasion and Dissemination. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–19, 2012.
- BLACKFORD, A. N.; JACKSON, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. **Molecular Cell**, v. 66, n. 6, p. 801–817, 2017.
- BOESEN, T.; EMMERSEN, J.; JENSEN, L. T.; LADEFOGED, S. A.; THORSEN, P.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. The *Mycoplasma hominis* vaa gene displays a mosaic gene structure. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 97–110, 1998.
- 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. 2577–86, dez. 2001.
- BOGEMA, D. R.; DEUTSCHER, A. T.; WOOLLEY, L. K.; SEYMOUR, L. M.; RAYMOND, B. B. A.; TACCHI, J. L.; PADULA, M. P.; DIXON, N. E.; MINION, F. C.; JENKINS, C.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Characterization of Cleavage Events in the Multifunctional Cilium Adhesin Mhp684 (P146) Reveals a Mechanism by Which *Mycoplasma hyopneumoniae* Regulates Surface Topography. 2012.
- BOLLAND, J. R.; DYBVIG, K. *Mycoplasma pulmonis* Vsa proteins and polysaccharide modulate adherence to pulmonary epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 331, n. 1, p. 25–30, jun. 2012.
- BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604–1607, 1981.
- BOYD, D. F.; THOMAS, P. G. Towards integrating extracellular matrix and immunological pathways. **Cytokine**, v. 98, n. 1, p. 79–86, out. 2017.
- BROWN, D. R.; MAY, M.; BRADBURY, J. M.; BALISH, M. F.; CALCUTT, M. J.; GLASS, J. I.; TASKER, S.; MESSICK, J. B.; JOHANSSON, K.; NEIMARK, H. Mycoplasma. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2018. 73p. 1–78.
- BROWNING, G. F.; MARENDA, 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.
- 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.

BURGER, K.; KETLEY, R. F.; GULLEROVA, M. Beyond the Trinity of ATM, ATR, and DNA-PK: Multiple Kinases Shape the DNA Damage Response in Concert With RNA Metabolism. **Frontiers in Molecular Biosciences** | www.frontiersin.org, v. 1, p. 61, 2019.

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.

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, n. 1, p. 53, 15 dez. 2015.

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.

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. 225, 2010.

CACCIOTTO, C.; CUBEDDU, T.; ADDIS, M. F.; ANFOSSI, A. G.; TEDDE, V.; TORE, G.; CARTA, T.; ROCCA, S.; CHESSA, B.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Mycoplasma lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1751–1762, dez. 2016.

CARAMELLI, M.; RU, G.; CASALONE, C.; BOZZETTA, E.; ACUTIS, P. L.; CALELLA, A.; FORLONI, G. Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Record**, v. 148, n. 17, p. 531–536, 28 abr. 2001.

CASTILHO JUNIOR, R. E.; DE ALMEIDA, C. A. S.; SANTOS, V. M.; AMORIM, A. T.; GAETA, N. C.; SOUZA, I. R.; SANTOS, M. B.; CAMPOS, G. B.; DE SOUZA, L. E. B.; DA CRUZ, J. F.; BENITES, N. R.; MARQUES, L. M.; TIMENETSKY, J. Detecting Mollicutes by PCR in goats in southwestern Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2021.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between Mycoplasma Lipoproteins and the Host Immune System. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 1997, p. 493–9, 1999.

CHAUDHRY, R.; VARSHNEY, A. K.; MALHOTRA, P. Adhesion proteins of *Mycoplasma pneumoniae*. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 690–699, 2007.

HAZEL, 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, jan. 2010.

CHEEMA, P. S.; SINGH, S.; KATHIRESAN, S.; KUMAR, R.; BHANOT, V.; SINGH, V. P. Synthesis of Recombinant P48 of *Mycoplasma agalactiae* by Site Directed Mutagenesis and its Immunological Characterization. **Animal Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 11–17, 2 jan. 2017.

CHEN, H.; YU, S.; SHEN, X.; CHEN, D.; QIU, X.; SONG, C.; DING, C. The *Mycoplasma gallisepticum* α -enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 4, p. 285–290, out. 2011.

CHEN, R.; YU, Y.; FENG, Z.; GAN, R.; XIE, X.; ZHANG, Z.; XIE, Q.; WANG, W.; RAN, T.; ZHANG, W.; XIONG, Q.; SHAO, G. Featured Species-Specific Loops Are Found in the Crystal Structure of Mhp Eno, a Cell Surface Adhesin From *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 209, 13 jun. 2019.

CHEN, X.; HUANG, J.; ZHU, H.; GUO, Y.; KHAN, F. A.; MENGHWAR, H.; ZHAO, G.; GUO, A. P27 (MBOV_RS03440) is a novel fibronectin binding adhesin of *Mycoplasma bovis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 7, p. 848–857, 1 out. 2018.

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.

CHOPRA-DEWASTHALY, R.; BAUMGARTNER, M.; GAMPER, E.; INNEREBNER, C.; ZIMMERMANN, M.; SCHILCHER, F.; TICHY, A.; WINTER, P.; JECHLINGER, W.; ROSENGARTEN, R.; SPERGSER, J. Role of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* pathogenesis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 66, n. 3, p. 307–22, dez. 2012.

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. 1196–210, mar. 2008.

CHOPRA-DEWASTHALY, R.; SPERGSER, J.; ZIMMERMANN, M.; CITTI, C.; JECHLINGER, W.; ROSENGARTEN, R.; LEWINSOHN, D. M. Vpma phase variation is important for survival and persistence of *Mycoplasma agalactiae* in the immunocompetent host. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 9, 2017.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 2010.

CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: Emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 196–203, 2013.

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.

COTTEW, G. S.; LLYOYD, L. C. An outbreak of pleurisy and pneumonia in goats in Australia attributed to a mycoplasma species. **J. COMP. PATH.**, v. 75, 1965.

COZENS, D.; READ, R. C. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1457–1468, 10 dez. 2012.

CZURDA, S.; HEGDE, S. M.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Xer1-independent mechanisms of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* are triggered by Vpma-specific antibodies. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 443–451, dez. 2017.

DAHL, J. The Role of Cholesterol in Mycoplasma Membranes. v. 20, p. 167–188, 1983.

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.

DANDO, S. J.; NITSOS, I.; KALLAPUR, S. G.; NEWNHAM, J. P.; POLGLASE, G. R. The Role of the Multiple Banded Antigen of *Ureaplasma parvum* in Intra-Amniotic Infection: Major Virulence Factor or Decoy? **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 29856, 2012.

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 GARNICA, M. L.; ROSALES, R. S.; GONZALO, C.; SANTOS, J. a; NICHOLAS, R. a J. Isolation, molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of isolates of *Mycoplasma agalactiae* from bulk tank milk in an endemic area of Spain. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 6, p. 1575–81, jun. 2013.

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.

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**, v. 170, n. 2, p. 257–9, set. 2005.

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**, v. 174, n. 3, p. 610–5, nov. 2007a.

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. 2340–5, 8 mar. 2007b.

DENG, X.; DAI, P.; YU, M.; CHEN, L.; ZHU, C.; YOU, X.; LI, L.; ZENG, Y. Cyclophilin A is the potential receptor of the *Mycoplasma genitalium* adhesion protein. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 3, p. 405–412, abr. 2018a.

DENG, X.; ZHU, Y.; DAI, P.; YU, M.; CHEN, L.; ZHU, C.; YOU, X.; LI, L.; ZENG, Y. Three polypeptides screened from phage display random peptide library may be the receptor polypeptide of *Mycoplasma genitalium* adhesion protein. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 140–146, jul. 2018b.

DEUTSCHER, A. T.; JENKINS, C.; MINION, F. C.; SEYMOUR, L. M.; PADULA, M. P.; DIXON, N. E.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 444–458, out. 2010.

DORDET-FRISONI, E.; FAUCHER, M.; SAGNÉ, E.; BARANOWSKI, E.; TARDY, F.; NOUVEL, L. X.; CITTI, C. Mycoplasma chromosomal transfer: A distributive, conjugative process creating an infinite variety of mosaic genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. OCT, p. 1–16, 2019.

DORDET-FRISONI, E.; SAGNÉ, E.; BARANOWSKI, E.; BRETON, M.; NOUVEL, X.; BLANCHARD, A. Chromosomal Transfers in *Mycoplasmas*: When Minimal Genomes. v. 5, n. 6, p. 1–11, 2014.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**. v.39, 2002.

DUMKE, R.; HAUSNER, M.; JACOBS, E. Role of *Mycoplasma pneumoniae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mediating interactions with the human extracellular matrix. **Microbiology**, v. 157, n. 8, p. 2328–2338, 1 ago. 2011.

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.

ESPINOZA, J. L.; MINAMI, M. Sensing Bacterial-Induced DNA Damaging Effects via Natural Killer Group 2 Member D Immune Receptor: From Dysbiosis to Autoimmunity and Carcinogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 25 jan. 2018.

FAHRER, J.; HUELSENBECK, J.; JAURICH, H.; DÖRSAM, B.; FRISAN, T.; EICH, M.; ROOS, W. P.; KAINA, B.; FRITZ, G. Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. **DNA Repair**, v. 18, n. 1, p. 31–43, 2014.

FENG, S.; XIONG, C.; WANG, G.; WANG, S.; JIN, G.; GU, G. Exploration of Recombinant Fusion Proteins YAPO and YAPL as Carrier Proteins for Glycoconjugate Vaccine Design against *Streptococcus pneumoniae* Infection. **Cite This: ACS Infect. Dis**, 2020.

FERRIS, P.; NEYROLLES, O.; CHAMBAUD, I.; BLANCHARD, A. Phase Variations of the *Mycoplasma penetrans* Main Surface Lipoprotein Increase Antigenic Diversity. **Infection And Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1569–1578, 1999.

FILIOUSSIS, G.; PETRIDOU, E.; GIADINIS, N. D.; KRITAS, S. K. In vitro susceptibilities of caprine *Mycoplasma agalactiae* field isolates to six antimicrobial agents using the E test methodology. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 654–656, 2014.

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. 5612–21, out. 2002.

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. 2814–22, ago. 2001.

FLITMAN-TENE, R.; LEVISOHN, S.; LYSNYANSKY, I.; RAPOPORT, E.; YOGEV, D. A chromosomal region of *Mycoplasma agalactiae* containing vsp-related genes undergoes in vivo rearrangement in naturally infected animals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 191, n. 2, p. 205–212, 2000.

FLITMAN-TENE, R.; LEVISOHN, S.; ROSENBUSCH, R.; RAPOPORT, E.; YOGEV, D. Genetic variation among *Mycoplasma agalactiae* isolates detected by the variant surface lipoprotein gene (vspA) of *Mycoplasma bovis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, n. 1, p. 123–128, 1997.

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

FREY, J.; LISANDRA, B. A.; RYCHENER, L. *Mycoplasma agalactiae* isolate JF4428 chromosome I. p. 1–174, 2016.

GAGNAIRE, A.; NADEL, B.; RAOULT, D.; NEEFJES, J.; GORVEL, J. P. Collateral damage: Insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. **Nature Reviews Microbiology**, 2017.

GAO, X.; BAO, S.; XING, X.; FU, X.; ZHANG, Y.; XUE, H.; WEN, F.; WEI, Y. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Mycoplasma bovis* is a plasminogen-binding adhesin. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 230–237, 1 nov. 2018.

GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**. 2018.

GLEW, M. D.; BASEGGIO, N.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; WALKER, I. D. Expression of the pMGA genes of *Mycoplasma gallisepticum* is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5' noncoding regions. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5833–5841, 1998.

GLEW, M. D.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, P. F.; WALKER, I. D. pMGA Phenotypic Variation in *Mycoplasma gallisepticum* Occurs In Vivo and Is Mediated by Trinucleotide Repeat Length Variation. **Infection and Immunity**, v. 68, 2000.

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. 5987–98, nov. 2002.

GLEW, M. D.; PAPAZISI, 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. 4539–48, ago. 2000b.

GOMES. T. L. S. MICOPLASMOSE (*Mycoplasma agalactiae*) E ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM CABRAS LEITEIRAS NO CARIRI PARAIBANO. **Dissertação, Universidade Federal de Campina Grande**, n. June, 2016.

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**, v. 198, n. 1, p. 48–56, out. 2013.

GOULET, M.; DULAR, R.; TULLY, J. G.; BILLOWES, G.; KASATIYA, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the Human Urogenital Tract. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 33, 1995.

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. **Arq. Inst. Biol**, v. 71, p. 233–235, 2004.

GRIMMER, J.; DUMKE, R. Organization of multi-binding to host proteins: The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Mycoplasma pneumoniae*. **Microbiological Research**, v. 218, p. 22–31, 1 jan. 2019.

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.

GRÜNDEL, A.; FRIEDRICH, K.; PFEIFFER, M.; JACOBS, E.; DUMKE, R. Subunits of the Pyruvate Dehydrogenase Cluster of *Mycoplasma pneumoniae* Are Surface-Displayed Proteins that Bind and Activate Human Plasminogen. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126600, 15 maio 2015.

GRÜNDEL, A.; PFEIFFER, M.; JACOBS, E.; DUMKE, R. Network of Surface-Displayed Glycolytic Enzymes in *Mycoplasma pneumoniae* and Their Interactions with Human Plasminogen. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 3, p. 666–676, 14 mar. 2016.

GUMULAK-SMITH, J.; TEACHMAN, A.; TU, A. H. T.; SIMECKA, J. W.; RUSSELL LINDSEY, J.; DYBVIG, K. Variations in the surface proteins and restriction enzyme systems of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of infected rats. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1037–1044, 2001.

GUO, Y.; ZHU, H.; WANG, J.; HUANG, J.; KHAN, F.; ZHANG, J.; GUO, A.; CHEN, X. TrmFO, a Fibronectin-Binding Adhesin of *Mycoplasma bovis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1732, 9 ago. 2017.

HAGEMANN, L.; GRÜNDEL, A.; JACOBS, E.; DUMKE, R. The surface-displayed chaperones GroEL and DnaK of *Mycoplasma pneumoniae* interact with human plasminogen and components of the extracellular matrix. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 3, p. 17, 1 abr. 2017.

HAMAGUCHI, T.; KAWAKAMI, M.; FURUKAWA, H.; MIYATA, M. Identification of novel protein domain for sialyloligosaccharide binding essential to *Mycoplasma mobile* gliding. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, p. 16, 2019.

HAMMERSCHMIDT, S.; ROHDE, M.; PREISSNER, K. T. Extracellular Matrix Interactions with Gram-Positive Pathogens. **Gram-Positive Pathogens, Second Edition**, p. 89–99, 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. 539–49, fev. 2008.

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, 2015a.

HEGDE, S.; HEGDE, S. M.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. *Mycoplasma agalactiae* Induces Cytopathic Effects in Infected Cells Cultured In Vitro. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163603, 23 set. 2016.

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.

HEGDE, S.; HEGDE, S.; ZIMMERMANN, M.; FLÖCK, M.; SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Simultaneous identification of potential pathogenicity factors of *Mycoplasma agalactiae* in the natural ovine host by negative selection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 7, p. 2751–2761, 2015b.

HEGDE, S.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Disruption of the pdhB Pyruvate Dehydrogenase Gene Affects Colony Morphology, In Vitro Growth and Cell Invasiveness of *Mycoplasma agalactiae*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119706, 23 mar. 2015.

HEGDE, S.; ZIMMERMANN, M.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Novel role of Vpmas as major adhesins of *Mycoplasma agalactiae* mediating differential cell adhesion and invasion of Vpma expression variants. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 2, p. 263–270, mar. 2018.

HORINO, A.; KENRI, T.; SASAKI, Y.; OKAMURA, N.; SASAKI, T. Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversions of phase-variable mpl lipoprotein genes in *Mycoplasma penetrans*. **Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 1241–1249, 1 abr. 2009.

HORINO, A.; SASAKI, Y.; SASAKI, T.; KENRI, T. Multiple Promoter Inversions Generate

Surface Antigenic Variation in *Mycoplasma penetrans*. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 1, p. 231–242, 2003.

HOSSEIN ABADI, E.; SAADATI, D.; NAJIMI, M.; HASSANPOUR, M. A study on *Mycoplasma agalactiae* and *Chlamydomphila abortus* in aborted ovine fetuses in Sistan and Baluchestan region, Iran. **Archives of Razi Institute**, v. 74, 2019.

HU, F.; ZHAO, C.; BI, D.; TIAN, W.; CHEN, J.; SUN, J.; PENG, X. *Mycoplasma gallisepticum* (HS strain) surface lipoprotein pMGA interacts with host apolipoprotein A-I during infection in chicken. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1343–1354, 9 fev. 2016.

HU, W.; ZHANG, W.; SHAH, S. W. A.; ISHFAQ, M.; LI, J. *Mycoplasma gallisepticum* infection triggered histopathological changes, oxidative stress and apoptosis in chicken thymus and spleen. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 114, p. 103832, 1 jan. 2021.

HUANG, J.; ZHU, H.; WANG, J.; GUO, Y.; ZHI, Y.; WEI, H.; LI, H.; GUO, A.; LIU, D.; CHEN, X. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase is involved in *Mycoplasma bovis* colonization as a fibronectin-binding adhesin. **Research in Veterinary Science**, v. 124, p. 70–78, 1 jun. 2019.

JAROCKI, V. M.; SANTOS, J.; TACCHI, J. L.; RAYMOND, B. B. A.; DEUTSCHER, A. T.; JENKINS, C.; PADULA, M. P.; DJORDJEVIC, S. P. MHJ_0461 is a multifunctional leucine aminopeptidase on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Open Biology**, v. 5, n. 1, p. 140175, jan. 2015.

KALISPERATI, P.; SPANOU, E.; PATERAS, I. S.; KORKOLOPOULOU, P.; VARVARIGOU, A.; KARAVOKYROS, I.; GORGOULIS, V. G.; VLACHOYIANNOPOULOS, P. G.; SOUGIOULTZIS, S. Inflammation, DNA damage, *Helicobacter pylori* and gastric tumorigenesis. **Frontiers in Genetics**, 2017.

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.

KIM-CAMPBELL, N.; GOMEZ, H.; BAYIR, H. Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis. In: **Critical Care Nephrology: Third Edition**. Elsevier Inc., 2019. p. 113–121.e2.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: Function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27–35, 2000.

KLEMM, P.; VEJBORG, R. M.; HANCOCK, V. Prevention of bacterial adhesion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 451–459, 8 set. 2010.

KO, Y.-P.; FLICK, M. J. Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection HHS Public Access. **Semin Thromb Hemost**, v. 42, n. 4, p. 408–421, 2016.

KORNSPAN, J. D.; TARSHIS, M.; ROTTEM, S. Invasion of melanoma cells by *Mycoplasma*

hyorhinis: Enhancement by protease treatment. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 2, p. 611–617, 2010.

KOSTNER, G. M.; AVOGARO, P.; SON, G. B.; CAZZOLATO, G.; OUINCI2, G. B. Determination of High-Density Lipoproteins: Screening Methods Compared. **CLIN. CHEM**, v. 6, 1979.

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.

LASARO, M. A.; MATHIAS-SANTOS, C.; RODRIGUES, J. F.; FERREIRA, L. C. S. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 93–99, jan. 2009.

LAW, R. H. P.; ABU-SSAYDEH, D.; WHISSTOCK, J. C. ScienceDirect New insights into the structure and function of the plasminogen / plasmin system. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 6, p. 836–841, 2013.

LI, P.; ZHANG, Y.; LI, X.; ZHOU, W.; LI, X.; JIANG, F.; WU, W. *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp597 is a cytotoxicity, inflammation and immunosuppression associated nuclease. **Veterinary Microbiology**, v. 235, p. 53–62, 1 ago. 2019.

LI, Y.; JIANG, Z.; XUE, D.; DENG, G.; LI, M.; LIU, X.; WANG, Y. *Mycoplasma ovipneumoniae* induces sheep airway epithelial cell apoptosis through an ERK signalling-mediated mitochondria pathway. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 222, 23 dez. 2016.

LIU, W.; SHOU, C. *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma fermentans* induce cell apoptosis and changes in gene expression profiles of 32D cells. **Biol Res**, v. 44, p. 383–391, 2011.

LIU, W.; ZHOU, D.; YUAN, F.; LIU, Z.; DUAN, Z.; YANG, K.; GUO, R.; LI, M.; LI, S.; FANG, L.; XIAO, S.; TIAN, Y. Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 92–100, 1 jan. 2019.

LIU, Y.; SHAHABUDIN, S.; FARID, S.; LEE, L. H.; MCVEIGH, A. L.; MACIEL, M.; POOLE, S. T.; BROADMAN, M.; PROUTY, M. G.; SAVARINO, S. J. Cross-Reactivity, Epitope Mapping, and Potency of Monoclonal Antibodies to Class 5 Fimbrial Tip Adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 88, 2020.

LIU, Y.; ZHOU, M.; XU, S.; KHAN, M. A.; SHI, Y.; QU, W.; GAO, J.; LIU, G.; KASTELIC, J. P.; HAN, B. *Mycoplasma bovis*-generated reactive oxygen species and induced apoptosis in bovine mammary epithelial cell cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 11, p. 10429–10445, 1 nov. 2020b.

LOPES, L. F. V.; DA SILVA, E. C.; DE MORAES, A. C. A.; DA SILVA, E. R.; SANTORO, K. R.; BATISTA, Â. M. V.; BARBOSA, S. B. P. *Mycoplasma agalactiae* and the *Mycoplasma mycoides* cluster in goat herds in the states of Pernambuco and Paraíba, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 5, p. 2261–2270, 2019.

LORIA, G. R.; PULEIO, R.; FILIOUSSIS, G.; ROSALES, R. S.; NICHOLAS, R. A. J. Contagious agalactia: costs and control revisited. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 38, n. 3, p. 695–702, 2019.

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.

LOVEJOY, C. A.; LI, W.; REISENWEBER, S.; THONGTHIP, S.; BRUNO, J. Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway. **PLoS Genet**, v. 8, n. 7, p. 1002772, 2012.

LU, T.; MOXLEY, R. A.; ZHANG, W. Mapping the Neutralizing Epitopes of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 (F4) Fimbrial Adhesin and Major Subunit FaeG. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 11, jun. 2019.

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.

MARQUES, L. M.; BUZINHANI, M.; NETO, R. L.; OLIVEIRA, R. C.; YAMAGUTI, M.; GUIMARAES, A. M.; TIMENETSKY, J. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. **Veterinary Record**, v. 165, n. 19, p. 572–573, 7 nov. 2009.

MARQUES, L. M.; REZENDE, I. S.; BARBOSA, M. S.; GUIMARÃES, A. M. S.; MARTINS, H. B.; CAMPOS, G. B.; DO NASCIMENTO, N. C.; DOS SANTOS, A. P.; AMORIM, A. T.; SANTOS, V. M.; FARIAS, S. T.; BARRENCE, F. Â. C.; DE SOUZA, L. M.; BUZINHANI, M.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; ZENTENO, M. E.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MESSICK, J. B.; TIMENETSKY, J. *Ureaplasma diversum* Genome Provides New Insights about the Interaction of the Surface Molecules of This Bacterium with the Host. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0161926, 7 set. 2016.

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. 83, 2010.

MATOS, R. A. T.; SANTOS, S. B.; ALVES, R. V.; SILVA, E. J.; MARINHO, M. L.; JOSÉ WILTON, P.; MOTA, R. A.; JÚNIOR, F. G. Occurrence and risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection in dairy goat herds of Paraíba State, Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 93–98, 2019.

MAY, M.; BROWN, D. R. Diversity of expressed vlhA Adhesin sequences and intermediate hemagglutination phenotypes in *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 9, p. 2116–2121, 2011.

MAY, M.; DUNNE, D. W.; BROWN, D. R. A Sialoreceptor Binding Motif in the *Mycoplasma synoviae* Adhesin VlhA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 110360, 2014.

MAY, M.; PAPAZISI, L.; GORTON, T. S.; GEARY, S. J. Identification of fibronectin-binding proteins in *Mycoplasma gallisepticum* strain R. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1777–1785, 2006.

MONECKE, S.; HELBIG, J. H.; JACOBS, E. Phase variation of the multiple banded protein in *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 2–3, p. 203–211, 2003.

MONTERO-BLAY, A.; MIRAVET-VERDE, S.; LLUCH-SENAR, M.; PIÑERO-LAMBEA, C.; SERRANO, L. SynMyco transposon: Engineering transposon vectors for efficient transformation of minimal genomes. **DNA Research**, v. 26, n. 4, p. 327–339, 2019.

MONTERO-BLAY, A.; PIÑERO-LAMBEA, C.; MIRAVET-VERDE, S.; LLUCH-SENAR, M.; SERRANO, L. Inferring Active Metabolic Pathways from Proteomics and Essentiality Data. **Cell Reports**, v. 31, n. 9, 2 jun. 2020.

MORGENTHAU, A.; POGOUTSE, A.; ADAMIAK, P.; MORAES, T. F.; SCHRYVERS, A. B. Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: Molecular mechanisms and role in host-microbe interactions. **Future Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1575–1585, 2013.

NANDRE, R. M.; RUAN, X.; DUAN, Q.; SACK, D. A.; ZHANG, W. Antibodies derived from an enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesin tip MEFA (multiepitope fusion antigen) against adherence of nine ETEC adhesins: CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS21 and EtpA. **Vaccine**, v. 34, n. 31, p. 3620–3625, 30 jun. 2016.

NANDRE, R.; RUAN, X.; LU, T.; DUAN, Q.; SACK, D.; ZHANG, W. Enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin-toxoid multiepitope fusion antigen CFA/I/II/IV-3xSTaN12S-mnLTG192G/L211A derived antibodies inhibit adherence of seven adhesins, neutralize enterotoxicity of LT and STa toxins, and protect piglets against diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 3, 1 mar. 2018.

NI, B.; BAI, F.; WEI, Y.; LIU, M.; FENG, Z.; XIONG, Q.; HUA, L.; SHAO, G. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 11429–11443, 2015.

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.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; MCAULIFFE, L. Vaccines for Mycoplasma Diseases in Animals and Man. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, p. 85–96, 2009.

NOUVEL, L. X.; MARENDI, M.; SIRAND-PUGNET, P.; SAGNÉ, E.; GLEW, M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; BARRÉ, 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.

NOUVEL, L. X.; SIRAND-PUGNET, P.; MARENDI, M. S.; SAGNÉ, E.; BARBE, V.; MANGENOT, S.; SCHENOWITZ, C.; JACOB, D.; BARRÉ, A.; CLAVEROL, S.;

BLANCHARD, A.; CITTI, C. Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. **BMC genomics**, v. 11, p. 86, jan. 2010.

OIE, *World Organisation for Animal Health*. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. In: **OIE Terrestrial Manual**. Chapter 3.7.3, 2018.

PAES, J. A.; VIRGINIO, V. G.; CANCELA, M.; LEAL, F. M. A.; BORGES, T. J.; JAEGER, N.; BONORINO, C.; SCHRANK, I. S.; FERREIRA, H. B. Pro-apoptotic effect of a *Mycoplasma hyopneumoniae* putative type I signal peptidase on PK(15) swine cells. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 170–176, mar. 2017.

PATEL, S.; MATHIVANAN, N.; GOYAL, A. Bacterial adhesins, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, 2017.

PATERNA, A.; SÁNCHEZ, A.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C.; DE LA FE, C.; CONTRERAS, A.; AMORES, J. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 7073–7076, 2013.

PEIXOTO, R. M.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; DOS SANTOS, V. W. S.; DE SOUSA, M. M.; DE AZEVEDO, D. A. A.; DAMASCENO, E. M.; TEIXEIRA, M. F. D. S. *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat flocks bred in state of Ceará in association with Caprine Arthritis Encephalitis virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 1–7, 2018.

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.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, n. 4, p. 1477–1494, 1996.

PICKERING, A. C.; VITRY, P.; PRYSTOPIUK, V.; GARCIA, B.; HÖÖK, M.; SCHOENEBECK, J.; GEOGHEGAN, J. A.; DUFRÊNE, Y. F.; FITZGERALD, J. R. Host-specialized fibrinogen-binding by a bacterial surface protein promotes biofilm formation and innate immune evasion. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 6, p. e1007816, 19 jun. 2019.

PILLOT, A.; DEFONTAINE, A.; FATEH, A.; LAMBERT, A.; PRASANNA, M.; FANUEL, M.; PIPELIER, M.; CSABA, N.; VIOLO, T.; CAMBERLEIN, E.; GRANDJEAN, C. Site-Specific Conjugation for Fully Controlled Glycoconjugate Vaccine Preparation. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 1 nov. 2019.

POUMARAT, F.; GAUTIER-BOUCHARDON, A.; BERGONIER, D.; GAY, E.; TARDY, F. Diversity and variation in antimicrobial susceptibility patterns over time in *Mycoplasma agalactiae* isolates collected from sheep and goats in France. **Journal of Applied Microbiology**, p. n/a-n/a, fev. 2016.

PRASANNA, M.; SOULARD, D.; CAMBERLEIN, E.; RUFFIER, N.; LAMBERT, A.;

TROTTEIN, F.; CSABA, N.; GRANDJEAN, C. Semisynthetic glycoconjugate based on dual role protein/PsaA as a pneumococcal vaccine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 129, p. 31–41, 1 mar. 2019.

QI, J.; ZHANG, F.; WANG, Y.; LIU, T.; TAN, L.; WANG, S.; TIAN, M.; LI, T.; WANG, X.; DING, C.; YU, S. Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* pyruvate dehydrogenase alpha and beta subunits and their roles in cytoadherence. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208745, 10 dez. 2018.

RAWADI, G.; ROMAN-ROMAN, S. Mycoplasma membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 2, p. 637–643, fev. 1996.

RAYMOND, B. B. A.; MADHKOOR, R.; SCHLEICHER, I.; UPHOFF, C. C.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C. B.; ROHDE, M.; PADULA, M. P.; DJORDJEVIC, S. P. Extracellular Actin Is a Receptor for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 54, 2018.

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

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183–190, 2010.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. **MICROBIOL.MOL.BIOL.REV.**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1998.

ROBINSON, J. W.; DANDO, S. J.; NITSOS, I.; NEWNHAM, J.; POLGLASE, G. R. *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Multiple Banded Antigen Size Variation after Chronic Intra-Amniotic Infection/Colonization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 62746, 2013a.

ROBINSON, M. W.; BUCHTMANN, K. A.; JENKINS, C.; TACCHI, J. L.; RAYMOND, B. B. A.; TO, J.; ROY CHOWDHURY, P.; WOOLLEY, L. K.; LABBATE, M.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C. B.; PADULA, M. P.; DJORDJEVIC, S. P. MHJ_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Open Biology**, v. 3, n. 4, p. 130017, abr. 2013b.

ROLLENHAGEN, J. E.; WOODS, C. M.; O'DOWD, A.; POOLE, S. T.; TIAN, J. H.; GUEBRE-XABIER, M.; ELLINGSWORTH, L.; PROUTY, M. G.; GLENN, G.; SAVARINO, S. J. Evaluation of transcutaneous immunization as a delivery route for an enterotoxigenic *E. coli* adhesin-based vaccine with CfaE, the colonization factor antigen 1 (CFA/I) tip adhesin. **Vaccine**, v. 37, n. 42, p. 6134–6138, 30 set. 2019.

ROSALES, R. S.; PULEIO, R.; LORIA, G. R.; CATANIA, S.; NICHOLAS, R. A. J. *Mycoplasmas*: Brain invaders? **Research in Veterinary Science**, V., , 1 ago. 2017.

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. 6213–6, nov. 1999.

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. 201–10, fev. 2000.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 417–32, abr. 2003.

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

RUFFIN, D. C. Mycoplasma Infections in Small Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 315–332, jul. 2001.

SACHSE, K.; HELBIG, J. H.; LYSNYANSKY, I.; GRAJETZKI, C.; MÜLLER, W.; JACOBS, E.; YOGEV, D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 680–687, 2000.

SANCHIS, R.; ABADIE, G.; LAMBERT, M.; CABASSE, E.; DUFOUR, P.; GUIBERT, J. M.; PÉPIN, M. Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: Comparative pathogenicity of six field strains. **Veterinary Research**, v. 31, n. 3, p. 329–337, 2000.

SANTOS-JUNIOR, M. N.; REZENDE, I. S.; SOUZA, C. L. S.; BARBOSA, M. S.; CAMPOS, G. B.; BRITO, L. F.; QUEIROZ, É. C.; BARBOSA, E. N.; TEIXEIRA, M. M.; DA SILVA, L. O.; SILVA, L. S. C.; NASCIMENTO, F. S.; DA SILVA, T. L.; MARTENS, A. A.; SIQUEIRA, A. F. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; BASTOS, B. L.; GUIMARÃES, A. M. S.; TIMENETSKY, J.; MARQUES, L. M. *Ureaplasma diversum* and Its Membrane-Associated Lipoproteins Activate Inflammatory Genes Through the NF- κ B Pathway via Toll-Like Receptor 4. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 12 jul. 2018.

SANTOS, L. M. M. dos; PEREIRA, C. S.; MANSUR, F. J.; LOPES, L. de A.; CAMPOS, A. C.; AZEVEDO, E. O. de; CASTRO, R. S. de; BARRETO, M. L.; ALMEIDA, J. F. de; NASCIMENTO, E. R. do. *Mycoplasma agalactiae* outbreak in a goat herd of Rio de Janeiro State, Brazil. **20th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology**, 2014.

SCHMIDL, S. R.; GRONAU, K.; HAMES, C.; BUSSE, J.; BECHER, D.; HECKER, M.; STÜLKE, J. The Stability of Cytadherence Proteins in *Mycoplasma pneumoniae* Requires Activity of the Protein Kinase PrkC. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 184–192, 2010.

SEYMOUR, L. M.; DEUTSCHER, A. T.; JENKINS, C.; KUIT, T. A.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; CROSSETT, B.; PADULA, M.; DIXON, N. E.; DJORDJEVIC, S. P.; WALKER, M. J. A Processed Multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* Adhesin Binds Fibronectin, Plasminogen, and Swine Respiratory Cilia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33971–33978, out. 2010.

SEYMOUR, L. M.; FALCONER, L.; DEUTSCHER, A. T.; MINION, F. C.; PADULA, M. P.; DIXON, N. E.; DJORDJEVIC, S. P.; WALKER, M. J. Mhp107 Is a Member of the Multifunctional Adhesin Family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10097–10104, mar. 2011.

SEYMOUR, L. M.; JENKINS, C.; DEUTSCHER, A. T.; RAYMOND, B. B. A.; PADULA, M. P.; TACCHI, J. L.; BOGEMA, D. R.; EAMENS, G. J.; WOOLLEY, L. K.; DIXON, N. E.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 81–94, jan. 2012.

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.

SILWEDEL, C.; HAARMANN, A.; FEHRHOLZ, M.; CLAUS, H.; SPEER, C. P.; GLASER, K. More than just inflammation: *Ureaplasma* species induce apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 38, 14 dez. 2019.

SIMMONS, W. L.; DYBVIG, K. The Vsa Proteins Modulate Susceptibility of *Mycoplasma pulmonis* to Complement Killing, Hemadsorption, and Adherence to Polystyrene. **Infection and immunity**, v. 71, n. 10, p. 5733–5738, 2003.

SINCOCK, S. A.; HALL, E. R.; WOODS, C. M.; O'DOWD, A.; POOLE, S. T.; MCVEIGH, A. L.; NUNEZ, G.; ESPINOZA, N.; MILLER, M.; SAVARINO, S. J. Immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin vaccine in mice and nonhuman primates. **Vaccine**, v. 34, n. 2, p. 284–291, 4 jan. 2016.

SINGH, B.; FLEURY, C.; JALALVAND, F.; RIESBECK, K. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. **FEMS Microbiology Reviews**, nov. 2012.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MARENDA, 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.

SOLANKI, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Host-bacteria interaction and adhesin study for development of therapeutics. **International Journal of Biological Macromolecules**. V., , 1 jun. 2018. .

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.

STAATS, C. C.; BOLDO, J.; BROETTO, L.; VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Comparative genome analysis of proteases, oligopeptide uptake and secretion systems in *Mycoplasma* spp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 225–229, 2007.

STANDEVEN, K. F.; ARIËNS, R. A. S.; GRANT, P. J. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. **Blood Reviews**, v. 19, n. 5, p. 275–288, 25 set. 2005.

STONES, D. H.; KRACHLER, A. M. Fatal attraction: How bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them. **International Journal of Molecular Sciences**, 23 jan. 2015.

STOYANOVA, T.; ROY, N.; KOPANJA, D.; RAYCHAUDHURI, P.; BAGCHI, S. DDB2 (Damaged-DNA binding protein 2) in nucleotide excision repair and DNA damage response. **Cell Cycle**. v. 8, 15 dez. 2009.

STRACKER, T. H.; PETRINI, J. H. J. The MRE11 complex: Starting from the ends. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, NIH Public Access, , fev. 2011.

SULLIVAN, M. R.; BERNSTEIN, K. A. RAD-ical new insights into RAD51 regulation. **Genes**, v. 9, 1 dez. 2018.

SUWAKI, N.; KLARE, K.; TARSOUNAS, M. RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, 1 out. 2011.

SWEENEY, E. L.; KALLAPUR, S. G.; MEAWAD, S.; GISSLEN, T.; STEPHENSON, S.-A.; JOBE, A. H.; KNOX, C. L. *Ureaplasma* Species Multiple Banded Antigen (MBA) Variation Is Associated with the Severity of Inflammation In vivo and In vitro in Human Placentae. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 123, 13 abr. 2017.

TARDY, F.; BARANOWSKI, E.; NOUVEL, L.-X.; MICK, V.; MANSO-SILVÀN, 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. 4659–68, jul. 2012.

THOMPSON, C. C.; VIEIRA, N. M.; CAROLINA, A.; VICENTE, P.; THOMPSON, F. L. Infection , Genetics and Evolution Towards a genome based taxonomy of Mycoplasmas. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1798–1804, 2011.

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. 2764–8, 16 jul. 1999.

TULLY, J. . . Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. [s.l.] San Diego: Academic Press Inc, 1995. p. 33–40.

UCHIDA, K.; NAKAHIRA, K.; MIMURA, K.; SHIMIZU, T.; DE SETA, F.; WAKIMOTO, T.; KAWAI, Y.; NOMIYAMA, M.; KUWANO, K.; GUASCHINO, S.; YANAGIHARA, I. Effects of *Ureaplasma parvum* lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 100, n. 2, p. 118–127, dez. 2013.

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.

VACA, D. J.; THIBAU, A.; SCHÜTZ, M.; KRAICZY, P.; HAPPONEN, L.; MALMSTRÖM, J.; KEMPF, V. A. J. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 3, p. 277–299, 2020.

VAN ITERSOM, W.; RUYS, A. C. The fine structure of the mycoplasmataceae (microorganisms of the pleuropneumonia group = PPLO). 1. *Mycoplasma hominis*, *M. fermentans* and *M. salivarium*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 3, n. 3, p. 282–301, fev. 1960.

VENGADESAN, K.; NARAYANA, S. V. L. **Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins** Protein Science Wiley-Blackwell, , maio 2011.

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. 369–80, abr. 2008.

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.

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

WANG, J.; LI, Y.; PAN, L.; LI, J.; YU, Y.; LIU, B.; ZUBAIR, M.; WEI, Y.; PILLAY, B.; OLANIRAN, A. O.; CHILIZA, T. E.; SHAO, G.; FENG, Z.; XIONG, Q. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) moonlights as an adhesin in *Mycoplasma hyorhinis* adhesion to epithelial cells as well as a plasminogen receptor mediating extracellular matrix degradation. **Veterinary Research**, v. 52, n. 1, p. 1–14, 2021.

WANG, K.; LI, L.; ZHANG, Y.; GAO, D. Crosstalk between signaling pathways and DNA damage response. **Genome Instability & Disease**, v. 1, n. 2, p. 81–91, mar. 2020.

WIDJAJA, M.; HARVEY, K. L.; HAGEMANN, L.; BERRY, I. J.; JAROCKI, V. M.; RAYMOND, B. B. A.; TACCHI, J. L.; GRÜNDEL, A.; STEELE, J. R.; PADULA, M. P.; CHARLES, I. G.; DUMKE, R.; DJORDJEVIC, S. P. Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11227, 11 dez. 2017.

WILLIAMS, C. R.; CHEN, L.; DRIVER, A. D.; ARNOLD, E. A.; SHEPPARD, E. S.;

LOCKLIN, J.; KRAUSE, D. C. Sialylated Receptor Setting Influences *Mycoplasma pneumoniae* Attachment and Gliding Motility. **Molecular Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 735–744, 1 set. 2018.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4238–44, 2000.

WISE, K. S.; FOECKING, M. F.; RÖSKE, K.; LEE, Y. J.; LEE, Y. M.; MADAN, A.; CALCUTT, M. J. Distinctive Repertoire of Contingency Genes Conferring Mutation- Based Phase Variation and Combinatorial Expression of Surface Lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* Phylogenetic Cluster. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 13, p. 4926–4941, jul. 2006.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological reviews**. v, 51, 1987.

WU, X.; ZHANG, S.; LONG, C.; AN, Z.; XING, X.; WEN, F.; BAO, S. *Mycoplasmas bovis* P48 induces apoptosis in EBL cells via an endoplasmic reticulum stress-dependent signaling pathway. **Veterinary Microbiology**, v. 255, p. 109013, 1 abr. 2021.

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, 2016a.

XIONG, Q.; ZHANG, B.; WANG, J.; NI, B.; JI, Y.; WEI, Y.; XIAO, S.; FENG, Z.; LIU, M.; SHAO, G. Characterization of the role in adherence of *Mycoplasma hyorhinis* variable lipoproteins containing different repeat unit copy numbers. **Veterinary Microbiology**, v. 197, p. 39–46, dez. 2016b.

XUE, D.; LI, Y.; JIANG, Z.; DENG, G.; LI, M.; LIU, X.; WANG, Y. A ROS-dependent and Caspase-3-mediated apoptosis in sheep bronchial epithelial cells in response to *Mycoplasma Ovipneumoniae* infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 187, p. 55–63, 1 maio 2017.

YAN, S.; SORRELL, M.; BERMAN, Z. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v, 71, 2014.

YIWEN, C.; YUEYUE, W.; LIANMEI, Q.; CUIMING, Z.; XIAOXING, Y. Infection strategies of mycoplasmas: Unraveling the panoply of virulence factors. **Virulence**, v. 12, 2021.

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, Y.; LIU, M.; HUA, L.; QIU, M.; ZHANG, W.; WEI, Y.; GAN, Y.; FENG, Z.; SHAO, G.; XIONG, Q. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase encoded by a core gene of *Mycoplasma hyopneumoniae* contributes to host cell adhesion. **Vet Res**, v. 49, p. 114, 2018a.

YU, Y.; WANG, H.; WANG, J.; FENG, Z.; WU, M.; LIU, B.; XIN, J.; XIONG, Q.; LIU, M.; SHAO, G. Elongation factor thermo unstable (EF-Tu) moonlights as an adhesin on the surface

of *Mycoplasma hyopneumoniae* by binding to fibronectin. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018b.

YU, Y.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; LI, Y.; WANG, Z.; LI, G.; WANG, G.; XIN, J. GroEL Protein (Heat Shock Protein 60) of *Mycoplasma gallisepticum* Induces Apoptosis in Host Cells by Interacting with Annexin A2. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 9, set. 2019.

YUS, E.; MAIER, T.; MICHALODIMITRAKIS, K.; VAN NOORT, V.; YAMADA, T.; CHEN, W.-H.; WODKE, J. a H.; GÜELL, M.; MARTÍNEZ, S.; BOURGEOIS, R.; KÜHNER, S.; RAINERI, E.; LETUNIC, I.; KALININA, O. V.; RODE, M.; HERRMANN, R.; GUTIÉRREZ-GALLEGO, R.; RUSSELL, R. B.; GAVIN, A.-C.; BORK, P.; SERRANO, L. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1263–8, 27 nov. 2009.

ŽGUR-BERTOK, D. DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 9–12, 2013.

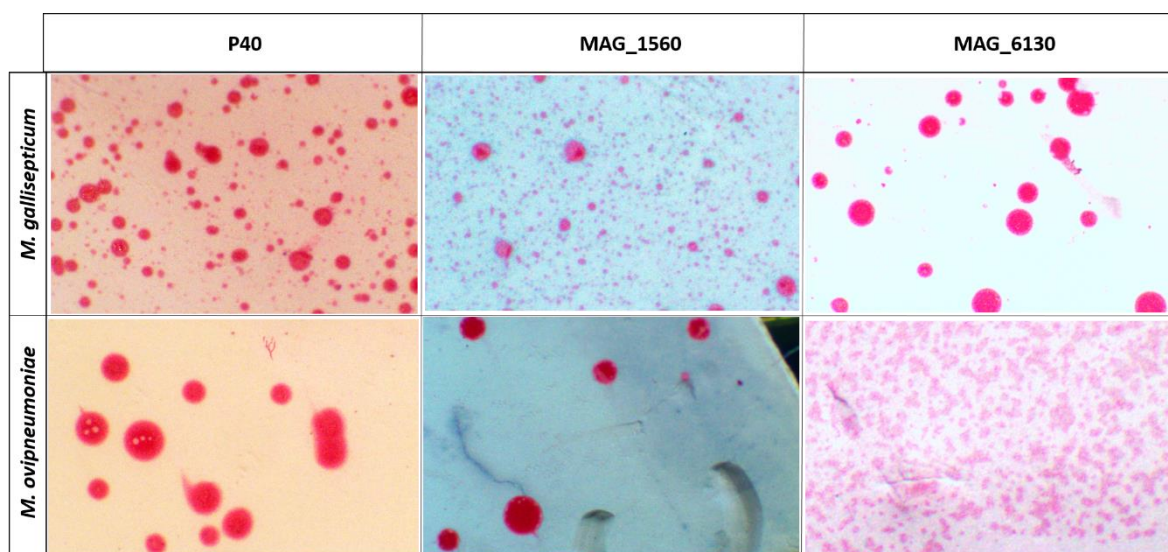
ZHANG, H.; ZHAO, G.; GUO, Y.; MENGHWAR, H.; CHEN, Y.; CHEN, H.; GUO, A. *Mycoplasma bovis* MBOV_rs02825 encodes a secretory nuclease associated with cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 628, 1 maio 2016.

ZHAO, G.; ZHANG, H.; CHEN, X.; ZHU, X.; GUO, Y.; HE, C.; ANWAR KHAN, F.; CHEN, Y.; HU, C.; CHEN, H.; GUO, A. *Mycoplasma bovis* NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O₂ reducing enzyme and an adhesin. **Scientific Reports**, 2017.

ZHAO, G.; ZHU, X.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; SCHIECK, E.; HU, C.; CHEN, H.; GUO, A. Novel Secreted Protein of *Mycoplasma bovis* MbovP280 Induces Macrophage Apoptosis Through CRYAB. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 619362, 15 fev. 2021.

ZHAO, Y.; ZOU, M.; SUN, Y.; ZHANG, K.; PENG, X. gga-miR-21 modulates *Mycoplasma gallisepticum* (HS strain)-Induced inflammation via targeting MAP3K1 and activating MAPKs and NF- κ B pathways. **Veterinary Microbiology**, v. 237, p. 108407, 1 out. 2019.

APÊNDICE A - Colony blotting de colônias de *Mycoplasma ovipneumoniae* e *M. gallssepticum* imobilizadas em membrana de nitrocelulose



Legenda: A cor rosa é resultado da aplicação do contra-corante *Ponceau S* e indica ausência de reação cruzada entre os anticorpos específicos avaliados em *M. gallssepticum* (superior) e *M. ovipneumoniae* (abaixo). Concentrações do anticorpo primário $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (anti-P40), $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MAG_1560) e $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (anti-MAG_6130). Imagens feitas em estereomicroscópio Nikon SMZ-U.

Fonte: Elaborada pela autora.

Anexo A - Genes avaliados pelo Kit *Human DNA Damage Signaling Pathway* - RT² Profiler™ PCR Array (Qiagen)

(continua)

Símbolo	Descrição
ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BAX	BCL2-associated X protein
BBC3	BCL2 binding component 3
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>)
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>)
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)
CIB1	Calcium and integrin binding 1 (calmyrin)
CRY1	Cryptochrome 1 (photolyase-like)
CSNK2A2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide
DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
EXO1	Exonuclease 1
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
H2AFX	H2A histone family, member X
HUS1	HUS1 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>)
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12

Anexo A - Genes avaliados pelo Kit Human DNA Damage Signaling Pathway - RT² Profiler™ PCR Array (Qiagen)

(continuação)

Símbolo	Descrição
MBD4	Methyl-CpG binding domain protein 4
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
MCPH1	Microcephalin 1
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (<i>E. coli</i>)
MLH3	MutL homolog 3 (<i>E. coli</i>)
MPG	N-methylpurine-DNA glycosylase
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>E. coli</i>)
MSH3	MutS homolog 3 (<i>E. coli</i>)
NBN	Nibrin
NTHL1	Nth endonuclease III-like 1 (<i>E. coli</i>)
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (<i>S. cerevisiae</i>)
PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase
PPM1D	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
RAD1	RAD1 homolog (<i>S. pombe</i>)
RAD17	RAD17 homolog (<i>S. pombe</i>)
RAD18	RAD18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD21	RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>)
RAD50	RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD51	RAD51 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD51B	RAD51 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD9A	RAD9 homolog A (<i>S. pombe</i>)
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8
REV1	REV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RNF168	Ring finger protein 168
RNF8	Ring finger protein 8
RPA1	Replication protein A1, 70kDa

**Anexo A - Genes avaliados pelo Kit Human DNA Damage Signaling Pathway - RT²
Profiler™ PCR Array (Qiagen)**

(conclusão)

Símbolo	Descrição
SIRT1	Sirtuin 1
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
SUMO1	
TOPBP1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
TP53	Tumor protein p53
TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1
TP73	Tumor protein p73
UNG	Uracil-DNA glycosylase
XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3
XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6

Anexo B – Certificado do curso de Biossegurança



Anexo C – Certificado do curso de Uso de Animais em Experimentação



**Uso de animais
para experimentação**



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Maysa Santos Barbosa

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 2 fevereiro 2017
Comissão de Biotérios
ICB USP

Anexo D – Certificado do curso Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos



Declaro, para os devidos fins, que

Maysa Santos Barbosa

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 28 novembro 2016
(Declaração válida por 5 anos)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Helayne Freitas".

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. C. Bittencourt".

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB