

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**IZADORA DE SOUZA REZENDE**

**Análise da variabilidade genética e imunoinformática da glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum* e sua relação com a constituição, antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular**

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

São Paulo  
2021

**IZADORA DE SOUZA REZENDE**

**Análise da variabilidade genética e imunoinformática da glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum* e sua relação com a constituição, antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Versão original

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)

Rezende, Izadora de Souza  
Análise da variabilidade genética e  
imunoinformática da glicosiltransferase de  
Ureaplasma diversum e sua relação com a constituição,  
antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo  
capsular. / Izadora de Souza Rezende; orientador  
Jorge Timenetsky; coorientador Lucas Miranda  
Marques. -- São Paulo, 2021.  
106 p.

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

1. Ureaplasma diversum. 2. Glicosiltransferase.  
3. Cápsula. 4. Imunogenicidade. 5. Bioinformática.  
I. Timenetsky, Jorge, orientador. II. Marques,  
Lucas Miranda, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Izadora de Souza Rezende

Titulo da Dissertação/Tese: Análise da variabilidade genética e imunoinformática da glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum* e sua relação com a constituição, antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública 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:.....



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da participação do polissacarídeo capsular e da proteína "multiple-banded antigen" na patogenicidade de Ureaplasma diversum*", registrado sob o protocolo nº **16/2017**, 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 **29/06/2017** 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: *Izadora de Souza Rezende (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](http://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 "*Evaluation of the participation of capsular polysaccharide and the "multiple band antigen" protein in the pathogenicity of Ureaplasma diversum*", protocol nº **16/2017**, 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 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 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 **6/29/2017** 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: *Izadora de Souza Rezende (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>Bovinos</i>	<i>Bovino</i>	<i>Fêmea/female</i>		<i>10</i>

São Paulo, 30 de junho de 2017.

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

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



Universidade Federal da Bahia  
 Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira  
 COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS  
 (CEUA - IMS/CAT - UFBA)



**PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 085/2019 - Apreciação em 23/10/2019 – Aprovado sem restrições**

**Título:** Análise da variabilidade genética e imunoinformática da glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum* e sua relação com a constituição, antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular

**Protocolo:** 085/2019

**Pesquisador:** Lucas Miranda Marques

**Instituição:** Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da variabilidade genética e imunoinformática da glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum* e sua relação com a constituição, antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular**", Protocolo nº 085/2019, do pesquisador **Lucas Miranda Marques**, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi **aprovado** na 31ª Reunião Ordinária do dia 02 de setembro de 2019.

**CERTIFICATE**

The Committee on Ethics in Animal Use (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project "**Analysis of the genetic and immunoinformatics variability of glycosyltransferase from *Ureaplasma diversum* and its relationship with the constitution, antigenicity and immunogenicity of the capsular polysaccharide** " Protocol nº 085/2019 of the researcher **Lucas Miranda Marques** who was submitted to the evaluation of this Commission is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was **approved** at the 31th ordinary meeting on 09/02/2019.

Vitória da Conquista, 23 de outubro de 2019.

Ricardo Evangelista Fraga  
 Vice-Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA

Aos meus pais, Teodoro e Elizete, pelo referencial de força e fé e pelo apoio imensurável para a realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, à Abrahão e aos amigos pelo suporte emocional e torcida pelo sucesso.

## **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 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) processo número 140083/2017-0.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder a graça de persistir pelos meus sonhos, vencendo os desafios. Por me iluminar e capacitar ao longo do caminho e pela certeza de Sua constante presença. Sem essa força vital, nada seria possível.

Aos meus pais, Teodoro e Liza, nem toda gratidão do mundo é suficiente para vocês! Com vocês ao meu lado, me sinto segura e capaz de realizar qualquer coisa. Vocês são minha base sólida, incentivo, exemplo. Agradeço por iluminarem meu caminho e serem meu referencial de força e fé. Vocês são o meu coração batendo fora do meu corpo! Eu amo vocês!!!

Às minhas irmãs, Izabela e Izaura, e ao meu sobrinho João Teodoro por todos os sorrisos proporcionados e por estarem sempre comigo. Por fazerem meu papel quando ausente em casa e mostrarem o amor incondicional.

Aos meus avós, Salvino e Terezinha (*in memorian*), anjos no céu! Palavras não são suficientes para agradecer tudo o que sempre fizeram por mim, por nós.

Aos meus tios, tias, primos e primas, pelo incentivo constante e pelos reencontros calorosos e amorosos. Obrigada pela torcida pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timenetsky, por todas as palavras sempre tão sábias. Agradeço pelas oportunidades proporcionadas e por se fazer presente mesmo nos momentos de distância. Os anos sob sua orientação fizeram aumentar o amor pela pesquisa e pela micoplasmologia. Obrigada pelas conversas francas, conselhos e inteligência emocional. Por todo o conhecimento compartilhado e por mostrar a humanidade em um trabalho sempre bem feito.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, pela oportunidade de realizar tantos sonhos ao longo desses anos. Você é um anjo que Deus colocou em minha vida! Agradeço todo o conhecimento, oportunidades e pela confiança depositada em mim, como pessoa e profissional. Por ser mais que um professor e orientador, mas um exemplo a ser seguido. Agradeço pela amizade e por todos os conselhos. Você é fundamental para a concretização de mais esse sonho.

A Abrahão pela presença diária, por ser meu colo e ombro amigo. Por ser sempre tão presente e me dar tanto apoio. Por tantas vezes em que acreditou mais no meu potencial do que eu mesma. Sua companhia, amor e atenção são essenciais pra

mim. Obrigada por estar sempre comigo e apoiar meus sonhos. Também à sua família, por me acolher e compartilhar tantas alegrias.

A minha mãe paulista, Aricelma França, a Celminha/“Celmãezinha”. Obrigada por todo amor e atenção, por todas as mensagens tão afetuosas. Guardo todos os seus conselhos e sua paciência e carinho no meu coração. Seu incentivo tornou essa caminhada mais leve, mesmo com a distância. Obrigada por todo o conhecimento transmitido da maneira mais doce do mundo! Você é um exemplo para mim!

Ao Prof. Dr. Luís Carlos, do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV), e à Profa. Ana Marcia de Sá Guimarães, do Laboratório de Micobactérias (LAPAM). Agradeço a todos pertencentes a estes grupos de pesquisa pelo apoio na realização de alguns experimentos.

A todos do Projeto Micro, do Laboratório de Microbiologia do IMS/CAT UFBA. Finalizar um doutorado em plena pandemia não seria possível sem o apoio de uma equipe tão unida e disposta a ajudar. Que esse sentimento de união e torcida fraterna perpetue ao longo do tempo. Agradeço a Janna e Laís pelo apoio quando não pude estar presente. Agradeço especialmente ao Manoel, por dividir a bancada e também os anseios e as alegrias pela finalização dessa etapa.

A todos do Laboratório de Micoplasmas (Celminha, Lucas, Maysa, Guilherme, Aline, Verena, Camila, Régis, Natália, Ana Márcia, Cristina, Patrícia, Lorena) pelas longas horas de trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e companheirismo. Especialmente agradeço a Guilherme e Maysa, companheiros de vida, estudo e de bancada.

A Verena pelas acolhidas sempre tão amorosas, ensinamentos e amizade. Sem o seu apoio nos momentos de desespero em meio a experimentos e incertezas tudo seria mais difícil. Agradeço a Deus por sua amizade.

Aos meus amigos de sempre, especialmente Beбето, Bolinha, William. A amizade de vocês torna minha vida mais leve. Vocês são os irmãos que escolhi para a vida. Por torcerem por mim e por compartilhar tantas alegrias e recordações amorosas. Por sempre vibrar pelas minhas conquistas e pelo incentivo para prosseguir.

As minhas biotecs lindas, Bel, Cathe e Rebeca, pela amizade sincera e pelos risos mesmo a distância. Sou muito feliz por ter vocês!

Às amigas Gisele, Caciara, Naide e Isabel das secretarias do Departamento de microbiologia. Obrigada pelo apoio, atenção e amizade. Por serem tão solícitas da

maneira mais descontraída possível. Especialmente a Gisele por tanto cuidado e afeto, sempre preocupada para que tudo desse certo e por torcer pelo nosso sucesso. Você é muito especial para mim!

A todos os funcionários da limpeza e portaria, por tornarem o ambiente de trabalho mais seguro e organizado, além de todos os sorrisos e preocupação aos fins de semana ou ao sair muito tarde.

Aos familiares e aos amigos que, de perto ou de longe, me acompanharam nessa jornada tornando essa caminhada mais leve e pelos momentos renovadores.

Vale lembrar que quem caminha sozinho pode até ir mais rápido, mas quem caminha acompanhado vai mais longe!

*“Dê-me, Senhor, agudeza para  
entender, capacidade para reter,  
método e faculdade para aprender,  
sutileza para interpretar, graça e  
abundância para falar. Dê-me,  
Senhor, acerto ao começar, direção  
ao progredir e perfeição ao  
concluir.”*

*São Tomás de Aquino*

## RESUMO

REZENDE, I. S. **Análise da variabilidade genética e imunoinformática da glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum* e sua relação com a constituição, antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular.** 2021. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A economia do setor agro-industrial está diretamente relacionada à saúde dos rebanhos. A ocorrência de infertilidade, pode ser causada por micoplasmas e ureaplasmas, e pode levar a prejuízos. *Ureaplasma diversum* pode causar infecções e ativar a resposta imune e ativação de TLR's (Toll Like Receptors), bem como maturação de citocinas pró-inflamatórias. O recente sequenciamento do genoma de *Ureaplasma diversum*, permitiu aprimorar a compreensão da biologia molecular destas infecções e ampliar as possibilidades de desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas e de prevenção. O objetivo deste estudo é avaliar a variabilidade genética e imunoinformática do gene da glicosiltransferase de *U. diversum* e sua relação com a constituição e antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular. Para tanto foi utilizada a cepa de referência de *U. diversum* ATCC 49782 e 52 isolados de swab vulvovaginal de bovinos. Foi realizada PCR para identificação do gene UD216, codificador da glicosiltransferase. Os amplicons foram sequenciados e construída uma árvore filogenética. As sequencias foram analisadas por meio de técnicas de bioinformática para predição de antigenicidade e características para expressão heteróloga. As análises de imuno e antigenicidade foram realizadas com cultura de PBMC bovinos. O ensaio de linfoproliferação foi feito por CFSE. Camundongos Balb/c foram usados para a produção de anticorpos policlonais. Foi avaliada a expressão gênica por qPCR de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR2, TLR4 e iNOS. O nitrito foi dosado pelo método de Griess. Após a realização de PCR dos 52 isolados de *U. diversum*, 69% (n=36) foram positivas para o gene UD216, distribuídas nos diferentes estados brasileiros de coleta. Com o sequenciamento, as amostras formaram grupos de acordo com a proximidade gênica entre elas, compreendendo amostras coletadas em um mesmo lugar. As predições por bioinformática informaram que a sequência codificante do gene UD216 não possui características de antigenicidade mas tem capacidade de ligação a alelos de MHCI. As variações na sequência e na composição de açúcares podem relacionar com mecanismos de variação antigênica e de escape a resposta imune. A presença do polissacarídeo capsular não induziu proliferação linfocitária em PBMC bovinos nem anticorpos específicos em camundongos. A expressão gênica de marcadores inflamatórios foi discreta, mas houve o aumento do nitrito nas culturas após a exposição ao CPS. Com os resultados obtidos será possível fomentar a discussão da importância e relevância do polissacarídeo capsular nas infecções por *U. diversum*, na reprodução e bovinocultura no cenário brasileiro e dar base para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos e terapias mais eficientes.

**Palavras-chave:** *Ureaplasma diversum*. Glicosiltransferase. Cápsula. Imunogenicidade. Bioinformática.

## ABSTRACT

REZENDE, I. S. **Analysis of the genetic and immunoinformatics variability of glycosyltransferase from *Ureaplasma diversum* and its relationship with the constitution, antigenicity and immunogenicity of the capsular polysaccharide.** 2021. 106 p. Thesis (Ph.D. thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The economy of the agro-industrial sector is directly related to the health of the herds. The occurrence of infertility can be caused by mycoplasmas and ureaplasmas, and can lead to damage. *Ureaplasma diversum* can cause infections and activate the immune response and activation of TLR's (Toll Like Receptors), as well as maturation of pro-inflammatory cytokines. The recent sequencing of the genome of *Ureaplasma diversum* has improved the understanding of the molecular biology of these infections and expanded the possibilities for developing new diagnostic and prevention alternatives. The aim of this study is to evaluate the genetic and immunoinformatics variability of the glycosyltransferase gene from *U. diversum* and its relationship with the constitution and antigenicity and immunogenicity of the capsular polysaccharide. For this purpose, the reference strain of *U. diversum* ATCC 49782 and 52 isolates of vulvovaginal swab from bovines were used. PCR was performed to identify the UD216 gene, encoding the glycosyltransferase. Amplicons were sequenced and a phylogenetic tree constructed. The sequences were analyzed using bioinformatics techniques to predict antigenicity and characteristics for heterologous expression. Immunogenicity and antigenicity analyzes were performed with bovine PBMC cultures. The lymphoproliferation assay was performed by CFSE. Balb/c mice were used to produce polyclonal antibodies. Gene expression was evaluated by qPCR of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TLR2, TLR4 and iNOS. Nitrite was measured using the Griess method. After PCR of the 52 *U. diversum* isolates, 69% (n=36) were positive for the UD216 gene, distributed in different Brazilian states of collection. With the sequencing, the samples formed groups according to the genetic proximity between them, comprising samples collected in the same place. Bioinformatics predictions indicated that the coding sequence of the UD216 gene does not have antigenicity characteristics, but is capable of binding to MHC I alleles. Variations in the sequence and composition of sugars may relate to mechanisms of antigenic variation and immune response escape. The presence of capsular polysaccharide did not induce lymphocyte proliferation in bovine PBMC or specific antibodies in mice. Gene expression of inflammatory markers was discreet, but there was an increase in nitrite in cultures after exposure to CPS. With the results obtained, it will be possible to promote the discussion of the importance and relevance of the capsular polysaccharide in infections by *U. diversum*, in reproduction and cattle raising in the Brazilian scenario and provide a basis for the development of more efficient diagnostic tests and therapies.

**Keywords:** *Ureaplasma diversum*. Glycosyltransferase. Capsule. Immunogenicity. Bioinformatics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Imagens de <i>Ureaplasma diversum</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
<b>Figura 02</b> - Etapas gerais na biossíntese de glicoconjugados.....	35
<b>Figura 3</b> – Modelo experimental da produção de anticorpos policlonais.....	49
<b>Figura 4.</b> Eletroforese dos produtos de PCR do gene UD216.....	55
<b>Figura 5.</b> Distribuição do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) no Brasil.....	56
<b>Figura 06</b> – Árvore filogenética obtida com o sequenciamento do gene UD216 de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	59
<b>Figura 07</b> - Predições pelo web-software IEDB Analysis Resource e CBTOPE.....	61
<b>Figura 08</b> - Microscopia eletrônica de células de <i>U. diversum</i> ,.....	67
<b>Figura 09</b> - Análise da reatividade de anticorpos policlonais ao polissacarídeo capsular de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	70
<b>Figura 10</b> – Ensaio de proliferação linfocitária (CFSE) pela marcação de linfócitos com FITC, após exposição de polissacarídeos de <i>U. diversum</i> .....	71
<b>Figura 11</b> - Expressão gênica de citocinas e TLR's em PBMC bovinos experimentalmente expostos por 2 e 6 horas com polissacarídeos capsulares de diferentes cepas de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	72
<b>Figura 12</b> - Expressão gênica de iNOS em PBMC bovinos experimentalmente expostos por 2 e 6 horas com polissacarídeos capsulares das amostras de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	73
<b>Figura 13</b> - Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos após 2 horas de exposição a variadas concentrações do polissacarídeo capsular de diferentes cepas de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	74
<b>Figura 14</b> - Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos após 6 horas de exposição a variadas concentrações do polissacarídeo capsular de diferentes cepas de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Rebanho bovino por estado brasileiro em 2019.....	23
<b>Tabela 02</b> – Estados brasileiros de origem dos isolados de <i>U. diversum</i> .....	40
<b>Tabela 03</b> - Iniciadores utilizados para identificação do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) de <i>U. diversum</i> .....	42
<b>Tabela 04</b> – Polimorfismos entre as seqüências do gene UD216 (glicosiltransferase) de isolados de <i>U. diversum</i> e sequencia depositada no GenBank.....	58
<b>Tabela 05</b> - Comparação entre <i>softwares</i> para predições de peptídeo sinal e predições da topologia das proteínas de membrana descritas nesse estudo.....	60
<b>Tabela 06</b> - Predição de antígenos conformacionais e lineares de linfócitos B e predição em antígenos de <i>U. diversum</i> .....	62
<b>Tabela 07</b> - Predição de epítomos para linfócitos TCD8+ ligantes para diferentes alelos BoLA.....	63
<b>Tabela 08</b> - Propriedades físico-químicas determinadas por ProtParam, Protein-Sol e SOLpro.....	64
<b>Tabela 09</b> - Predição de peptídeo sinal, presença de alça transmembrânica e localização subcelular.....	66
<b>Tabela 10</b> - Quantificação de carboidratos presentes no polissacarídeo capsular de amostras de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	68
<b>Tabela 11</b> - Caracterização dos carboidratos presentes no polissacarídeo capsular de amostras de <i>Ureaplasma diversum</i> .....	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

µL - Microlitro

µg – Micrograma

C - Citosina

*DNA* - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

*RNA* - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

*cDNA* – *Complementar Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

*dNTP* - Desoxinucleotídeo trifosfatado

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

G – Guanina

Kpb - Quilo pares de bases

UB – Ureaplasma broth

LPP - Lipoproteína

M - Molar

NaCl - Cloreto de Sódio

ng - Nanograma

nm - Nanomêtros

OIE - *World Organization for Animal Health*

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

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

pH - Potencial hidrogeniônico

RPM - Rotações por minuto

CCU – *Color Changing Unit*

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (células mononucleares do sangue periférico)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Bovinocultura.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Características gerais dos <i>Mollicutes</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Virulência dos micoplasmas .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Micoplasmoses na reprodução bovina.....</b>	<b>27</b>
2.4.1 <i>Mycoplasma bovis</i> e <i>Mycoplasma bovigenitalium</i> .....	28
2.4.2 <i>Ureaplasma diversum</i> .....	30
2.4.2.1 Cápsula polissacarídica e glicosiltransferase.....	33
<b>3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Estirpes bacterianas e condições de cultivo.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Análise de distribuição e diversidade gênica da glicosiltransferase (UD216) em isolados clínicos.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Análises <i>in silico</i> do gene da glicosiltransferase (UD216) em cepas de <i>U. diversum</i> .....</b>	<b>43</b>
4.3.1 Análises preliminares <i>in silico</i> do gene da glicosiltransferase (UD216) da cepa ATCC de <i>U. diversum</i> .....	43
4.3.2 Imunoinformática da sequência do gene da glicosiltransferase (UD216) dos isolados clínicos e da cepa ATCC de <i>U. diversum</i> .....	44
4.3.2.1 Mapeamento de epítomos de linfócitos B de bovinos e predição de antigenicidade.....	44
4.3.2.2 Mapeamento de epítomos e identidade de linfócitos TCD8 <sup>+</sup> de bovinos.....	44
4.3.2.3 Previsão de secreção e localização subcelular.....	45
4.3.2.4 Investigação de parâmetros físico-químicos das sequências de aminoácidos....	45
4.3.2.5 Refinamento de propriedades relacionadas à imunomodulação e expressão em um sistema heterólogo .....	45
<b>4.4 Cultivo de <i>U. diversum</i>, detecção, extração e quantificação de carboidratos do polissacarídeo capsular .....</b>	<b>46</b>

4.4.1 Crescimento e expansão da cultura de ureaplasma.....	46
4.4.2 Presença de cápsula.....	46
4.4.3 Extração do polissacarídeo capsular.....	47
4.4.4 Quantificação de carboidratos do polissacarídeo capsular .....	47
4.4.5 Avaliação da composição do polissacarídeo capsular .....	48
<b>4.5 Avaliação da imunogenicidade do polissacarídeo capsular.....</b>	<b>49</b>
4.5.1 Produção de anticorpos policlonais.....	49
4.5.2 Avaliação da cinética de produção de anticorpos policlonais antipolissacarídeo capsular.....	50
<b>4.6 Ensaios de antigenicidade dos polissacarídeos capsulares.....</b>	<b>50</b>
4.6.1 Coleta de sangue periférico bovino.....	50
4.6.2 Ensaio de proliferação de linfócitos.....	50
4.6.3 Avaliação de resposta imunológica <i>in vitro</i> de monócitos/macrófagos.....	51
4.6.3.1 Isolamento de monócitos bovinos .....	51
4.6.3.2 Inoculação de macrófagos com os polissacarídeos capsulares.....	52
4.6.3.3 Extração de mRNA de macrófagos bovinos.....	52
4.6.3.4 Síntese de cDNA .....	52
4.6.3.5 Expressão gênica de marcadores inflamatórios.....	53
4.6.3.6 Dosagem de óxido nítrico.....	53
<b>4.7 Tratamento Estatístico.....</b>	<b>54</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Análise de distribuição e diversidade gênica da glicosiltransferase (UD216) em isolados clínicos.....</b>	<b>55</b>
5.1.1 Amplificação do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) das amostras de isolados clínicos de <i>U. diversum</i> .....	55
5.1.2 Distribuição da glicosiltransferase em isolados de <i>U. diversum</i> .....	55
<b>5.2 Análise intra-específica do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) ...</b>	<b>56</b>
<b>5.3 Análises <i>in silico</i> do gene da glicosiltransferase (UD216) em isolados de <i>U. diversum</i>.....</b>	<b>60</b>
5.3.1 Análises <i>in silico</i> da sequencia depositada no GenBank do gene da glicosiltransferase (UD216) da cepa de referencia ATCC49782.....	60
5.3.2 Análise <i>in silico</i> da presença de epítomos para linfócitos B e T das sequencias dos isolados clínicos de <i>U. diversum</i> .....	61

5.3.3 Avaliação das características para expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i> ...	64
5.3.4 Avaliação da presença de sinal para excreção pelas vias clássicas e não clássicas .....	65
<b>5.4 Detecção, quantificação e caracterização de carboidratos do polissacarídeo capsular .....</b>	<b>67</b>
5.4.1 Presença de cápsula .....	67
5.4.2 Quantificação de carboidratos totais no polissacarídeo capsular .....	68
<b>5.5 Antigenicidade e Imunogenicidade do polissacarídeo capsular de <i>U. diversum</i></b>	<b>69</b>
<b>5.6 Ensaios de antigenicidade e virulência dos polissacarídeos capsulares.....</b>	<b>70</b>
5.6.1 Proliferação linfocitária.....	70
5.6.2 Expressão gênica.....	71
5.6.3 Dosagem de nitrito em sobrenadante da cultura de macrófagos bovinos .....	73
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Ureaplasma diversum* originalmente foi definido como espécie não-patogênica (KREPLIN, 1987; MARQUES et al, 2010). No entanto, foi demonstrado como patógeno oportunista, por causar danos extensos em bovinos, principalmente no trato genital. Em touros, pode causar baixa motilidade espermática, vesiculite seminal e epididimite (MULIRA et al, 1992; MARQUES et al, 2015). Em vacas, causa grave inflamação no sistema reprodutivo, podendo interferir na reprodução. A invasão celular por *U. diversum* causaria a ativação de receptores de resposta inflamatória provocando o prolongamento da biossíntese de prostaglandina. Todos os elementos associados no ambiente uterino causariam a impossibilidade de ovulação. Apesar disso, a maneira como este micro-organismo exerce sua virulência e patogenicidade em bovinos ainda é pouco conhecida (MARQUES et al., 2010).

A resposta imune dos hospedeiros às infecções por *U. diversum* também é pouco descrita, incluindo-se o papel das proteínas de superfície e seu potencial antigênico nestas bactérias (SANTOS-JUNIOR, 2021). Embora estudos clínicos tenham relatado uma associação entre afecções perinatais e infecção por ureaplasmas, principalmente em humanos, os fatores de virulência de *Ureaplasma spp.* associados a problemas na gestação continuam pouco conhecidos. A atividade biológica de várias moléculas de superfície de micoplasmas é estudada *in vitro* (USHIDA et al., 2013). Apresentamos o primeiro estudo de glicosiltransferase de *Ureaplasma diversum*.

Durante a co-evolução dos Mollicutes com humanos, os ureaplasmas aparentemente alcançaram uma coexistência bem-sucedida, com altos níveis populacionais considerando-se seus limitados recursos genômicos. Para tanto, estas bactérias precisaram reduzir algumas características da sua virulência, como a perda de grande parte da cápsula (sintetizada pela enzima glicosiltransferase) – tornando-se um pouco menos agressivos – e passando a utilizar um resíduo produzido pelo hospedeiro (uréia) como fonte de energia. Esta relação parasitária ou simbiótica contribui para a controvérsia associada ao estudo da infecção por ureaplasmas humanos (RAZIN et al., 1998; KONG e GILBERT, 2004).

O polissacarídeo capsular (CPS) desempenha papéis biológicos importantes para muitos microrganismos, como a absorção de nutrientes, proteção contra estresse ambiental, produção de biofilme, e resistência contra fagocitose ou atividade de

antibióticos. O CPS é um material também potencialmente importante para aplicações biotecnológicas e econômicas, como desenvolvimento de vacinas e melhorias nos métodos de diagnóstico (CAMPANERO-RHODES et al., 2020; MICOLI et al., 2018; FLANNERY et al., 2015; SCHMID et al., 2015; PARK et al., 2013; DISNEY e SEEBERGER, 2004).

A identificação de *U. diversum* ainda é inadequadamente interpretada, pois existem outros micoplasmas considerados de maior importância na pecuária. Apesar disso, a forte associação da inflamação no trato reprodutivo bovino com o nascimento prematuro de bezerros, torna necessário compreender a função de moléculas potencialmente envolvidas no estabelecimento da infecção. Após o sequenciamento do genoma de *U. diversum* (MARQUES et al., 2015), a possibilidade de realização de testes de antigenicidade e virulência e o estabelecimento de uma relação de base genética entre estes fatores, constituem os principais estudos atuais.

A alta frequência de detecção do ureaplasma, as grandes perdas econômicas na produção animal, os custos adicionais no diagnóstico, tratamento e prevenção indicam a necessidade de propor estratégias mais eficazes no controle das micoplasmoses. Para tanto é necessário compreender as bases da virulência e patogenicidade de *U. diversum*. Neste contexto, incluem-se o uso de estratégias melhores para prevenção da prematuridade em bovinos e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e novas terapias para o controle das infecções.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

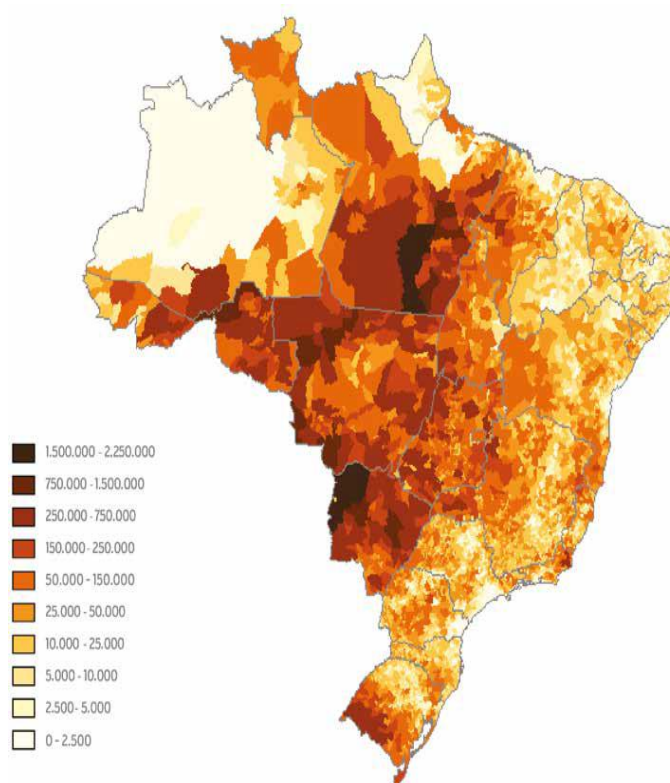
### **2.1 Bovinocultura**

O setor agro-industrial brasileiro tem destaque no agronegócio internacional, pois o país possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo e é o primeiro nas exportações de gado. Este segmento movimenta fortemente a economia do Brasil, gerando empregos na produção animal e industrial, melhorando de qualidade de vida da população. A bovinocultura brasileira proporciona o desenvolvimento de dois principais segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite, movimentando mais de 618,50 bilhões de reais em 2019. Com um rebanho de 213,68 milhões de cabeças distribuídas em todos os estados brasileiros (tabela 1), representando quase 13% do rebanho mundial. A pecuária brasileira registrou em 2019 aproximadamente 38,4 milhões de animais envolvidos na produção leiteira e 199,5 milhões cabeças com aptidão genética para corte (ABIEC, 2020).

A produção de carne bovina em 2021 foi de 10,5 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 4% em relação ao ano anterior. Fatores como flutuações das taxas de câmbio, frágil recuperação econômica mundial e o possível ressurgimento de infecções por coronavírus, podem afetar diretamente o futuro da indústria de proteína animal. Alguns programas governamentais apoiam a expansão da pecuária no Brasil, como o crédito agrícola subsidiado para melhoramento de pastagens, recuperação de pastagens degradadas, programas de cruzamento usando genética bovina importada, nutrição adequada e aumentando o uso de tecnologias reprodutivas (USDA, 2021). Durante os processos da produção animal são necessários os controles adequados de doenças infecciosas e parasitárias, boas práticas de nutrição, cruzamentos e manejo geral. Entre os diversos distúrbios que podem ocorrer e afetar a produção, a tendência a parição prematura, infertilidade, natimortos ou abortamentos podem causar os maiores impactos (BROMFIELD et al., 2015; POTTER et al., 2010; SHELDON, 2015).

**Tabela 1** - Rebanho bovino por estado brasileiro em 2019 (adaptado)

Estado	Rebanho estimado (cabeças)
Mato Grosso	29.873.068
Goiás	22.430.742
Minas Gerais	22.321.084
Mato Grosso do Sul	20.985.665
Pará	20.510.169
Rondônia	13.973.714
Rio Grande do Sul	12.918.325
São Paulo	10.638.629
Bahia	10.168.312
Paraná	9.280.273
Tocantins	8.300.111
Maranhão	7.808.833
Santa Catarina	4.305.489
Acre	2.968.239
Rio de Janeiro	2.514.790
Ceará	2.454.047
Espírito Santo	2.054.507
Pernambuco	1.881.396
Piauí	1.512.984
Amazonas	1.386.403
Alagoas	1.252.698
Paraíba	1.219.163
Sergipe	1.082.335
Rio Grande do Norte	890.570
Roraima	797.554
Distrito Federal	92.793
Amapá	54.582
<b>BRASIL</b>	<b>213.676.473</b>



Fonte: Athenagro, IBGE em Beef Report (ABIEC, 2020) (adaptado)

As doenças infecciosas atingem muitos animais em pouco tempo e o trato genital de bovinos é mais frequentemente atingido. A mastite, vulvovaginite e endometrite são distúrbios que direta ou indiretamente refletem na eficiência reprodutiva, sendo geralmente de transmissão horizontal. Esta situação se caracteriza



por baixas taxas de natalidade e mortalidade. A natalidade do rebanho é influenciada pela taxa de concepção, índice de mortalidade embrionária e abortamento. Nas perdas produtivas devido aos baixos índices reprodutivos de animais por doenças infecciosas, as micoplasmoses têm impacto neste contexto pouco conhecido (BROMFIELD et al., 2015; ENTRICAN, 2002; HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004; MILLER et al., 1994; POTTER et al., 2010; SHELDON, 2015).

## 2.2 Características gerais dos *Mollicutes*

A classe *Mollicutes* possui cerca de 200 espécies distribuídas pelas ordens *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Mycoplasmatales*, a qual é composta por duas famílias: *Mycoplasmataceae* e *Incertae sedis*. Os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* pertencem à família *Mycoplasmataceae* (BERGEY, 2010). Atualmente, novas metodologias são utilizadas para identificação e caracterização destes microrganismos, como a biologia sintética, metagenômica e análises filogenômicas (GROSJEAN et al., 2014; KAMMINGA et al., 2017; WANG et al., 2020; PIMENTEL et al., 2021).

*Mollicutes* são considerados os menores organismos de vida livre, podendo apresentar-se como células pleomórficas de diâmetro de 300 a 800 nm. Possuem genomas reduzidos, com baixo conteúdo de %G+C (aproximadamente 30%), utilizam UGA como códon codificador do triptofano (em vez da codificação universal de parada) variando de 580 a 2200 Kpb e codificando cerca de 600 proteínas. Por serem pequenos geralmente não causam turvação de meios de cultura líquidos, provocando somente alteração no pH. Relacionam-se filogeneticamente às bactérias gram-positivas das quais evoluíram de forma degenerativa. Dentre suas principais características, não possuem parede celular sendo, portanto sobrevivem apenas em ambientes isotônicos e de antibióticos beta-lactâmicos. Suas polimerases são resistentes à rifampicina. Pela sua capacidade biossintética limitada e por serem nutricionalmente exigentes, devido à redução metabólica, exigem para seu crescimento a presença de aminoácidos, nucleotídeos, esteróis e ácidos graxos exógenos no meio de cultura. A deficiência na via respiratória do ciclo do ácido tricarboxílico reduz sua capacidade de fosforilação oxidativa. Para a produção de ATP, podem fermentar a glicose ou hidrolisar a arginina, reduzindo ou aumentando o pH do meio, respectivamente (BEAMAN e POLLACK, 1983; BERGEY, 2010; RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998). Os ureaplasmas são únicos

entre os *Mollicutes* que requerem uréia para produzir ATP, hidrolizando este composto e produzindo amônia (BASEMAN; TULLY, 1997; RAZIN, 2004).

Na década de 1990, devido ao pequeno tamanho de seu genoma e ao cenário evolutivo predominante que se baseava apenas em sucessivas perdas de genes, não era considerada a ocorrência de ilhas gênicas e transferência horizontal de genes em micoplasmas (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998). À medida que aumentaram os estudos combinando genômica comparativa com abordagens clássicas de microbiologia observou-se que várias espécies de micoplasma, mais especificamente aquelas que infectam ruminantes, trocaram partes significativas de seus genomas durante a evolução e ainda retiveram a capacidade de conjugação (SIRAND-PUGNET et al., 2007; DORDET-FRISONI et al., 2014; DORDET-FRISONI et al., 2019). A transferência horizontal de genes é um dos principais mecanismos inovação microbiana e consiste na troca de ilhas genômicas entre as bactérias. A descoberta dos elementos conjugativos integrativos de micoplasma (MICEs) demonstrou que micoplasmas possuem elementos genéticos móveis complexos, fomentando as pesquisas sobre transferências gênicas horizontais dessas bactérias (CITTI et al., 2020).

Os molicutes são ubíquos e distribuem-se entre animais, plantas e insetos incluindo-se o homem. Entre os animais são encontrados em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, com especificidade para cada grupo animal. A especificidade ao hospedeiro e ao sítio anatômico ocorre pelas necessidades nutricionais variadas. No entanto tem-se demonstrado a capacidade de adaptação a hospedeiros não habituais pela sua capacidade de mutação. Normalmente são transmitidos por contato ou aerossóis entre os hospedeiros. Infectam principalmente as superfícies de mucosas, principalmente no trato respiratório, urogenital e reprodutivo, sistema nervoso, olhos, glândulas mamárias e articulações (BUZINHANI et al., 2007; RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998). Eventual baixa resposta imune ou alterações fisiológicas do hospedeiro favorecem a infecção e colonização destas bactérias (PITCHER e NICHOLAS, 2005). São considerados micro-organismos oportunistas por excelência, mas podem ser agentes primários de infecções de caráter agudo ou crônico. A doença crônica é a mais frequente (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994; RAZIN e HAYFLICK, 2010).

Embora os micoplasmas cresçam em meios acelulares, a preferência por células ocorre pela facilidade de obtenção de nutrientes essenciais. (BUZINHANI, METIFFOGO e TIMENETSKY, 2007). Para garantir sua sobrevivência com o genoma

reduzido nos nichos estudados, supõe-se que estas bactérias vivem em constante mutação (DAVID et al., 2002; DYBVIK e VOELKER, 1996). Os componentes da membrana citoplasmática de algumas espécies estudadas modulam a resposta imune principalmente no que se refere às citocinas. A diversidade das características destas bactérias e células dos hospedeiros, associados ou não, interferem no desenvolvimento das micoplasmoses (ROTTEM, 2003).

### **2.3 Virulência dos micoplasmas**

A virulência dos micoplasmas tem sido determinada por algumas das suas características biológicas. A exemplo tem-se a indução de estresse oxidativo e dano à membrana da célula hospedeira pela geração de peróxido de hidrogênio e radicais superóxido por micoplasmas aderentes; interferência no metabolismo e função celular pela competição por nutrientes; imunomodulação devido à presença de glicocálix ou estruturas eletrodensas na superfície da bactéria; modificação da resposta imune do hospedeiro pela alta frequência de variação de fase e consequente diversidade antigênica na superfície bacteriana. Incluem-se as aberrações cromossômicas na célula hospedeira pela secreção de enzimas fosfolipases, ATPases, hemolisinas, proteases e nucleases; escape da ação de antibióticos e resposta imune pela intracelularidade, favorecendo a cronicidade das doenças (CHANG et al., 2011).

Sem parede celular, os compostos da membrana celular dos micoplasmas expostos nos nichos de hospedeiros, são importantes na relação patógeno-hospedeiro. Verificou-se que algumas espécies apresentavam grande variação antigênica nesta estrutura mediados pela recombinação de sítios-específicos ou mutações de alta frequência no genoma. Assim, esta propriedade também contribui para a sobrevivência e adaptação ao ambiente intracelular e o consequente escape do sistema imune do hospedeiro (CITTI e BLANCHARD, 2013; RAZIN e HAYFLICK, 2010; RAZIN et al., 1998).

As lipoproteínas de membrana citoplasmática de micoplasmas representam aproximadamente 70% da massa da membrana com importância na sua antigenicidade (CHAMBAUD, WRÓBLEWSKI e BLANCHARD, 1999; RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998; YOU, ZENG e WU, 2006). Possuem um resíduo cisteinil amino-terminal, podendo ser N-acilado em algumas espécies (ZUO et al., 2009). A maioria das lipoproteínas de micoplasmas é exposta ao meio extracelular com o grupamento acil

ancorado à membrana citoplasmática. Funcionalmente, acredita-se que atuam como proteínas periplasmáticas de bactérias gram-negativas, como fator de virulência, como alvo para anticorpos inibidores de crescimento ou como imunomodulinas (BROWNING et al, 2011; ROSENGARTEN, 2000).

Os genes codificadores de lipoproteínas parecem estar no mesmo operon de transportadores ABC, levando à hipótese também estarem relacionados ao transporte de nutrientes. Este operon é conservado entre muitos micoplasmas patogênicos, demonstrando que, possivelmente, codifiquem um sistema de transporte de nucleotídeos essencial para o crescimento *in vivo* e virulência (BROWNING et al, 2011).

#### **2.4 Micoplasmoses na reprodução bovina**

Micoplasmas podem causar várias doenças em bovinos, incluindo mastite, artrite, pneumonia, otite média e distúrbios reprodutivos. Adultos e bezerros podem ser afetados por artrite e pneumonia, enquanto a otite é tipicamente observada apenas em bezerros. Todas essas manifestações clínicas podem afetar o rebanho concomitantemente com a mastite causada por micoplasmas. Os principais distúrbios reprodutivos causados são a vulvovaginite, infertilidade, endometrite, distocia e aborto. A natureza altamente contagiosa de alguns *Mycoplasma spp.*, sua baixa resposta aos tratamentos convencionais e implicações de descarte de animais relacionado ao rebanho afetado, evidenciam a importância do diagnóstico rápido e preciso para o controle e prevenção de surtos de infecções nos rebanhos (MAUNSELL et al., 2011).

As micoplasmoses em bovinos podem ser graves e resultar em impactos negativos significativos para a economia e bem-estar animal. Diante de um surto, muitas vezes há questões de diagnóstico relacionadas à origem e distribuição da infecção dentro e entre os rebanhos. A abordagem diagnóstica adotada deve considerar as restrições orçamentárias, a urgência do resultado, a disponibilidade dos testes ou a combinação entre eles, o tipo de amostra e as condições de manuseio. Embora gere resultados mais lentos, a cultura fornece o diagnóstico definitivo que pode ser usado para análises moleculares para investigar a fonte da infecção e relação dos isolados com outras cepas do organismo. Os ensaios de PCR (Polimerase Chain Reaction/Reação em cadeia da polimerase) fornecem resultados mais rápidos. Uma vez detectados, os DNA alvo, a facilidade de decisões eficazes em relação ao gado clinicamente afetado

aumenta. Assim, há oportunidade de manejo para reduzir o risco de transmissão das doenças (PARKER et al., 2017).

A patogênese da micoplasmose genital é pouco compreendida, mas é provável que envolva a ativação de macrófagos e outras células do sistema imunológico na interface materno-fetal. Alguns estudos caracterizam inicialmente os fatores de virulência de algumas espécies e que podem explicar como um organismo, que carece de LPS (lipopolissacarídeo), estimula a produção de citocinas associadas com parto prematuro. Dada a forte associação da inflamação com o nascimento prematuro, a resposta imune poderia fornecer um mecanismo eficaz na prevenção da prematuridade causada por este organismo (PELTIER et al, 2007).

Várias são as infecções promovidas pelos micoplasmas, porém especificamente a vulvovaginite bovina foi descrita em diversos estudos (AMARAL, 2003; BEY, 2006; DOIG, et al, 1979; LYSNYANSKY et al., 2009). Esta inflamação resulta na ocorrência súbita de descarga vulvar, granulações na mucosa vaginal associada ou não com a presença de vesículas na vulva, em fêmeas na fase reprodutiva (GAMBARINI et al., 2009). Estudos sobre a ocorrência da vulvovaginite em rebanhos brasileiros demonstraram que em 57,15% dos casos o diagnóstico molecular foi positivo para *Mycoplasma spp*, valores estes, superiores aos descritos em outros países. Dentre os positivos, houve casos em que a vulvovaginite foi discreta, porém com histórico de aborto, contribuindo no questionamento sobre o envolvimento do *Mycoplasma spp* nas patologias reprodutivas bovinas (NASCIMENTO et al., 2005). Oliveira-Filho et al (2005) ressaltam a importância da avaliação de lesões na mucosa vulvo-vaginal especialmente em animais pertencentes aos sistemas intensivos de produção leiteira, uma vez que a sua principal via de transmissão é a venérea.

Entre as espécies de micoplasmas isoladas de bovinos, *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum* são consideradas as espécies de maior importância para as infecções do trato urogenital (BUZINHANI et al., 2007; LYSNYANSKY et al., 2009; STRINGFELLOW e GIVENS, 2000; KOZLOVA et al., 2019).

#### 2.4.1 *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma bovis genitalium*

*Mycoplasma bovis* e *M. bovis genitalium* têm sido associados com infertilidade e falhas reprodutivas em bovinos. Ambos foram isolados a partir de sêmen e são transmitidos no acasalamento natural e pela inseminação artificial (BIELANSKI,

DEVENISH e PHIPPS-TODD, 1999). As mesmas espécies foram isoladas da superfície da zona pelúcida associada à célula espermática e de embriões bovinos intactos, lavados ou tratados com antibióticos (BIELANSKI, DEVENISH e PHIPPS-TODD, 1999; BIELANSKI et al., 1989).

*Mycoplasma bovis* é altamente adaptado aos bovinos, porém foi isolado de outros ruminantes e humanos. Apesar de seu caráter não zoonótico, as infecções por *M. bovis* são responsáveis por problemas econômicos de saúde e bem-estar no mundo (DUDEK et al., 2020). A mastite bovina por *Mycoplasma spp* indica ser uma patologia emergente e as perdas econômicas por infecções de *M. bovis* podem ser mais frequentes do que as doenças respiratórias destes micro-organismos (FOX et al., 2003; NICHOLAS e AYLING, 2003). *Mycoplasma bovis* também causa endometrite, salpingite, ooforite, artrite, abortamento e vesiculite seminal. Em novilhas inseminadas com sêmen contaminado pelo agente foram observados episódios de repetição de cio (CARDOSO e VASCONCELLOS, 2004). Sua capacidade de suprimir a resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção já é conhecida, levando ao desenvolvimento de condições crônicas (ASKAR et al., 2021). Cai e colaboradores (2019) observaram a importância de monitorar a suscetibilidade de *M. bovis* aos antimicrobianos, uma vez que houveram mudanças nos níveis de MIC (Minimal Inhibitory Concentration / Concentração inibitória mínima) de vários antimicrobianos ao longo do tempo, com redução da eficácia *in vitro*.

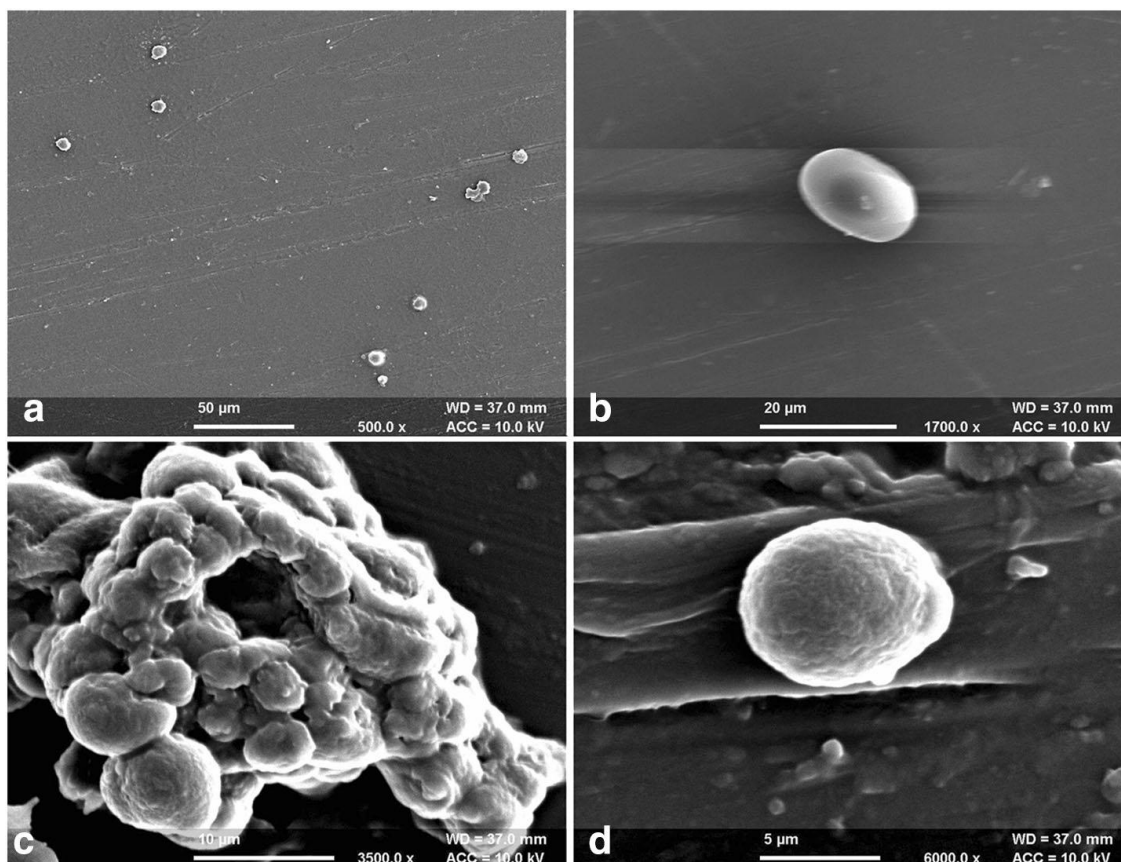
Considera-se *M. bovis genitalium* como o agente primário da vulvovaginite (DOIG et al., 1979) mas também causador de infertilidade, endometrite necrotizante, vesiculite seminal e diminuição da motilidade espermática (NICHOLAS et al., 2006; RUHNKE e ROSENDAL, 1994). As infecções genitais causadas pelo agente em fêmeas são caracterizadas por vulvovaginite granular, com descarga vaginal mucopurulenta, apresentando ou não infertilidade. Mastite e abortamento também são relatados (EAGLESOME et al., 1992; GONZÁLEZ e WILSON, 2003). Seu material genético também já foi identificado em um feto mumificado de bezerro de rebanho brasileiro de gado leiteiro (FRITZEN et al., 2021) e em úberes e vagina de vacas (HAZELTON et al., 2020; ITOH et al., 2021).

#### 2.4.2 *Ureaplasma diversum*

Ureaplasmas também pertencem aos *Mollicutes* e apesar de não possuírem parede celular, apresentam cápsula polissacarídica sobre a membrana celular. Os ureaplasmas requerem a ureia para crescerem, pois têm a urease para hidrolizá-la produzindo amônia. O crescimento ideal ocorre a 37°C e pH entre 5,5-6,0, sendo que o pH acima de 7,5 inibe seu crescimento. Alguns ureaplasmas infectam animais e outros, o homem. Estas bactérias podem aderir a células epiteliais, competir com nutrientes, interagir com células principalmente pelas proteínas de membrana, e liberar compostos metabólicos (BUZINHANI, METIFFOGO e TIMENETSKY, 2007; CHELMONSKA-SOYTA et al, 1994; MARQUES, 2009; MARQUES, 2010).

*U. diversum* é importante na pecuária colonizando o trato respiratório e reprodutivo de bovinos. A espécie é comumente isolada de amostras da mucosa cervicovaginal de fêmeas bovinas com trato reprodutivo saudável. Podem estar associados em patogenias como vulvite granular, endometrite, salpingite, vesiculite seminal, alveolite fetal, infertilidade e aborto (BUZINHANI, METIFFOGO e TIMENETSKY, 2007; CARDOSO et al., 2000; CHELMONSKA-SOYTA et al, 1994; MARQUES et al., 2010; MARQUES et al., 2013). A localização do ureaplasma na superfície e no interior de embriões bovinos também foi demonstrada (BRITTON et al., 1987; BRITTON et al., 1989; REZENDE, 2016).

**Figura 01** - Imagens de *Ureaplasma diversum* por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



**Legenda** - A imagem (a) representa a fissão binária ocorrendo em *U. diversum* com aumento de 500 ×. Esta é uma divisão celular característica encontrada em *Ureaplasmas spp.* Imagens (b) e (d) mostram a estrutura globular de *U. diversum* com aumento de 1700 e 6000×, respectivamente. A imagem (c) indica a presença de *U. diversum* em aglomerados com ampliação de 3500×.

Fonte: Adaptado de Sharma et al. (2019).

Apesar do aumento nos estudos sobre a patogenicidade e virulência de *U. diversum*, sua detecção ainda permanece prevalente em rebanhos, causando perdas (CRANE e HUGHES, 2018; DIAZ et al., 2019; SHARMA et al., 2019). A identificação das infecções por *U. diversum* em bovinos, aumenta a preocupação com casos de resistência as principais terapias disponíveis para o controle. Isso se deve a observação da ocorrência de transferência horizontal de genes entre as diferentes bactérias presentes em um mesmo local de infecção (SILVA et al., 2019). Há um grande interesse na possibilidade de estimar a probabilidade de uma novilha estabelecer uma gravidez com base em seu microbioma vaginal, para estratégias de reprodução aprimoradas (DENG et al., 2019).



O sequenciamento recente do genoma de *U. diversum* (MARQUES et al., 2015) e as análises e testes posteriores (MARQUES et al., 2016; ANDRADE et al., 2020; SANTOS-JUNIOR et al., 2020) revelaram características importantes. Análise genômica, estudos de prevalência e ensaios de imunomodulação compõem as principais linhas de pesquisa atuais para tentar elucidar a patogênese desta bactéria (MARQUES et al., 2016; ANDRADE et al., 2020; SANTOS-JUNIOR et al., 2020). As vias metabólicas correspondem às mesmas encontradas em ureaplasmas humanos, como a via de síntese de ATP pela hidrólise da ureia. Em relação à patogenicidade, foram encontrados genes codificadores das enzimas urease, hemolisina, fosfolipase e também de um grande número de lipoproteínas e de variação antigênica. Dentre estas últimas encontra-se a lipoproteína de superfície “multiple-banded antigen-like” (semelhante a proteína mba, considerada um dos principais fatores de virulência em ureaplasmas humanos). São lipoproteínas diaciladas, contendo peptídeo sinal e um sítio de acilação, que têm sido geralmente utilizadas em métodos de sorotipagem de ureaplasmas humanos. Podem variar de tamanho e fase *in vitro* e *in vivo* agravando o estado da infecção e inflamação em modelo experimental com *U. parvum* (KNOX et al., 2010; DANDO et al., 2012; USHIDA, et al., 2013). Estudos com *U. parvum*-MBA parcialmente purificado, demonstraram a capacidade de tal molécula induzir a ativação de NF- $\kappa$ B via TLR's 1, 2 e 6 *in vitro* (SHIMIZU et al., 2008), semelhantes aos resultados encontrados no estudo com *U. diversum* (MARQUES et al., 2016).

Os estudos sobre a relação de *U. diversum* e os distúrbios reprodutivos foram considerados controversos no passado, pois acreditava-se que estes micro-organismos eram comensais e não estavam relacionados com os problemas de infertilidade nos rebanhos. Posteriormente foi detectado em amostras de mucosas cervico-vaginal e sêmen de touros aparentemente sadios. Ao longo do tempo, o acúmulo de dados indicou a relação patogênica deste ureaplasma com fetos abortados e descargas vulvares anormais, sendo implicado também na ocorrência da vulvovaginite granular em rebanhos. Com o encontro frequente em fêmeas bovinas com histórico de aborto, este micro-organismo passou a ter importância na saúde animal. O aborto por *U. diversum* pode ser resultado da placentite e da pneumonia fetal que ocorrem principalmente no último trimestre da prenhez (KUNDSIN et al., 1978; NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Apesar da importância de *U. diversum* em bovinos a sua relação como agente infeccioso permanece inconclusiva, pois pode ser encontrado em animais sem sintomas de alterações reprodutivas (MARQUES et al., 2011). Há ainda poucos dados sobre a aderência e internalização em células reprodutivas ou outras linhagens celulares bovinas, bem como informações conclusivas sobre o seu modo de ação durante as infecções. Análises recentes demonstraram que *U. diversum* tem capacidade de invadir células Hep-2, induzir a apoptose (AMORIM et al., 2014), bem como aumentar a produção de TNF- $\alpha$  no útero de camundongos experimentalmente infectados (SILVA et al., 2016).

Estudos demonstram que *U. diversum*, quando presente no sistema reprodutivo de vacas pode causar danos ao oócito, útero e epitélio do oviduto ou afetar o desenvolvimento do embrião, causando infertilidade ou falhas na gestação (DOIG et al., 1980). Este ureaplasma pode estar infectando e promovendo alterações morfológicas em espermatozoides de touros (HOBSON et al., 2013; BUZINHANI et al., 2011). Há relatos que sugerem o potencial de *U. diversum* infectar embriões e, em seguida, resultar em perdas gestacionais nas novilhas receptoras. Os resultados *post mortem* concluíram que a infecção por este ureaplasma causou o aborto em 3 dos 4 casos avaliados (CRANE e HUGHES, 2018)

Atualmente, na bovinocultura, são utilizadas biotécnicas na reprodução como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* (PIV) de embriões. Os agentes infecciosos presentes no trato reprodutivo dos bovinos podem reduzir o número e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, ocasionar doenças nos animais receptores e nos neonatos (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000). De acordo com o Sub-comitê de Pesquisa da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (International Embryo Transfer Society–IETS), *U. diversum* é classificado na Categoria 4, que agrupa doenças para as quais ainda não são disponíveis dados suficientes para que haja uma conclusão sobre os riscos de transmissão ou ainda, doenças onde os riscos de transmissão via transferência de embriões não podem ser negligenciados (International Embryo Transfer Society, 1998).

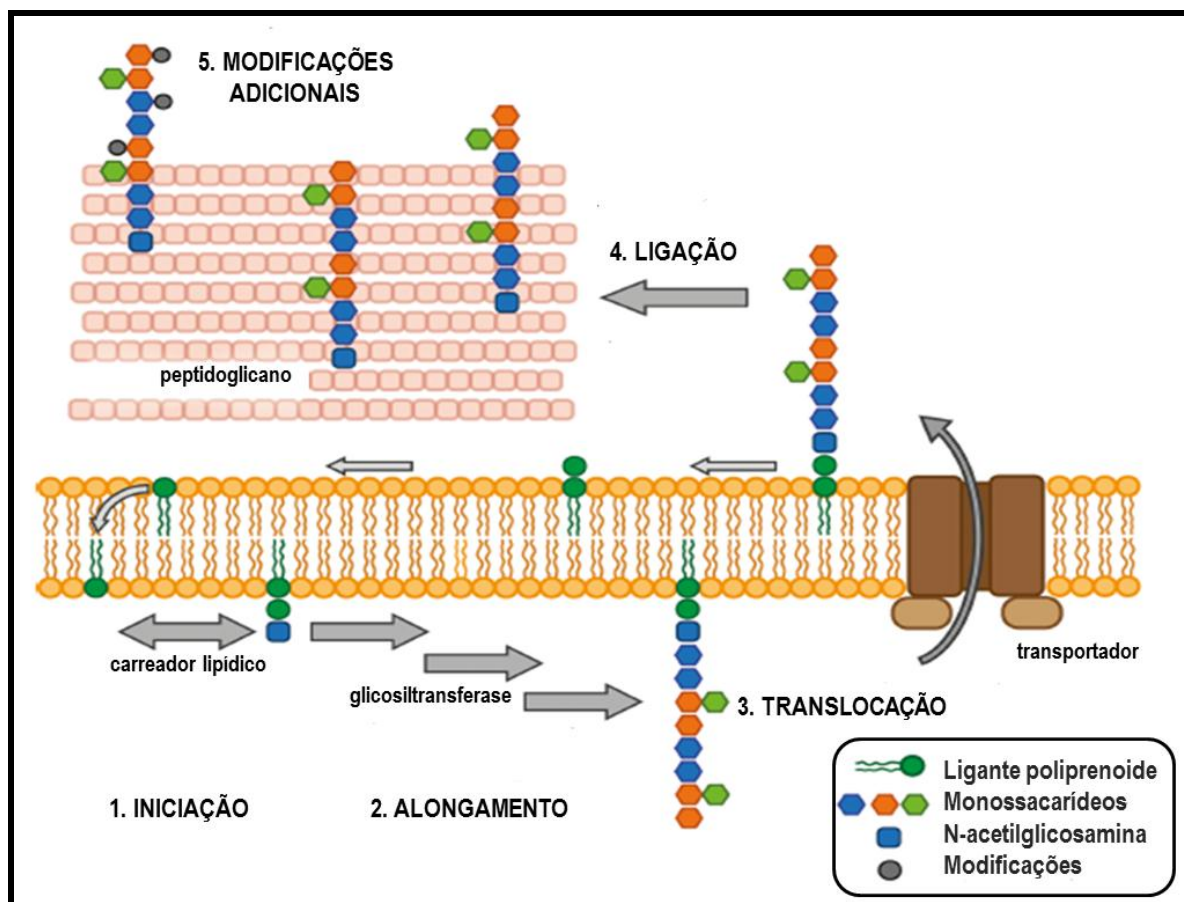
#### 2.4.2.1 Cápsula polissacarídica e glicosiltransferase

Em 1985, Smith observou a composição da superfície de *Ureaplasma spp.* Neste estudo pioneiro, identificou a presença de açúcares, ácidos graxos, glicerol e fósforo,

além de que o material capsular era constituído por lipoglicanos de glicose e manose, principalmente. No entanto, cada cepa era composta por lipoglicanos distintos, e a localização da superfície sugere que as diferenças estruturais entre os lipoglicanos poderiam contribuir para a especificidade antigênica, apesar de que ainda não se sabia o significado destes para as interações biológicas. Atualmente, já se sabe que algumas cápsulas e polissacarídeos são fundamentais para facilitar a disseminação de micoplasmas e na sustentação de uma infecção crônica (YIWEN et al., 2021).

A cápsula é constituída de monossacarídeos de alto peso molecular, altamente hidratados, unidos por ligações glicosídicas, podendo ser composta por homo ou heteropolímeros, os quais podem ser substituídos por moléculas orgânicas e inorgânicas. Este processo é catalisado pela transferência de sacarídeos por ação estabelecida pela glicosiltransferase (MOREMEN e HALTIWANGER, 2019; ROBERTS, 1996). De maneira geral (Figura 02), a biossíntese começa com a ativação de um carreador lipídico, no lado citoplasmático da membrana. Em seguida há o alongamento da cadeia pela adição sequencial de precursores de açúcar (monossacarídeos) pelas glicosiltransferases. Estes precursores (unidades repetidas ou glicoconjugado completo) atravessam transportadores na membrana, ligados a lipídeos. Os glicoconjugados ligam-se ao peptidoglicano ou a algumas proteínas, com possibilidades de modificações adicionais após sua ancoragem na parede celular. Uma determinada combinação de genes específicos dos polímeros é um forte preditor da estrutura do polissacarídeo e, portanto, do tipo sorológico bacteriano (sorotipo) (MISTOU et al., 2016; MOSTOWY e HOLT, 2018).

**Figura 02** - Etapas gerais na biossíntese de glicoconjugados



**Legenda** - Apesar da diversidade de glicoconjugados bacterianos, a biossíntese é bastante conservada e ocorre em cinco etapas básicas: (1) iniciação da biossíntese através da ativação de um carreador lipídico no lado citoplasmático da membrana, (2) alongamento por adição sequencial de monossacarídeos por glicosiltransferases para formar o polissacarídeo no ligante poliprenoide, (3) translocação de precursores ligados a lipídios através da membrana por transportadores, (4) ligação do glicoconjugado ao peptidoglicano e (5) modificações adicionais ao glicoconjugado que podem ocorrer após a ancoragem à parede celular.

Fonte: Adaptado de MISTOU et al., 2016.

Os aspectos genéticos relacionados à biossíntese de polissacarídeos têm implicações importantes para a geração de diversidade antigênica em bactérias. Isso porque combinação dos genes durante a síntese de um monossacarídeo pode alterar o sorotipo bacteriano, pela inativação de uma ou mais enzimas (perda genética) ou pela transferência horizontal de genes que leva a nova combinação de enzimas - geralmente com a ajuda de elementos transponíveis. A presença de genes conservados nas regiões flaqueadoras dos loci de síntese, também pode promover a troca de todo o locus por recombinação homóloga. Tais mudanças facilitam as alterações de sorotipo/antígeno

entre linhagens distantes sem ter que "inventar" uma nova combinação. Mudanças genéticas e epigenéticas em genes reguladores (variação de fase) podem afetar a expressão para composição da cápsula e a capacidade de colonizar ou infectar o hospedeiro. Dessa forma, os antígenos de polissacarídeos são mais flexíveis do que os antígenos proteicos, pois as modificações em sua estrutura provavelmente não requerem uma maquinaria genética muito complexa (MOSTOWY e HOLT, 2018).

O polissacarídeo de superfície celular é um dos aspectos de virulência identificados e que é pertinente às interações com a célula hospedeira. Possui atividade biológica, com missão de adesão celular, invasão, virulência e modulação imunológica (COMSTOCKAND e KASPER, 2006). Muitos micoplasmas possuem uma camada pegajosa semelhante a cápsula fora da membrana celular, constituída principalmente de polissacarídeos. Em *Mycoplasmas spp.* o polissacarídeo capsular é considerado um importante fator de virulência para as espécies patogênicas, atuando nos processos de adesão, invasão, variação de fase e defesa ao sistema imune do hospedeiro (YIWEN et al., 2021).

A presença da cápsula polissacarídica (CPS) pode ocorrer tanto em bactérias gram-negativas, quanto em bactérias gram-positivas, como espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus* (WEINTRAUB, 2003). No hospedeiro, utilizam mecanismos de virulência bem definidos para modificar a fisiologia celular e alterar o ambiente a ser colonizado (YAKOVLIEVA e WALVOORT, 2020). A produção de toxinas é o principal mecanismo de patogenicidade de *C. difficile*, sendo as toxinas A e B responsáveis pela diarreia e inflamação. As duas toxinas são glicosiltransferases, com estrutura semelhante e atuam incorporando glicose. São liberadas para ligarem-se às células hospedeiras. Quando internalizadas, atuam no citoplasma alterando as proteínas envolvidas na transdução de sinais, havendo perturbação das vias de sinalização celulares, particularmente aquelas que envolvem o citoesqueleto de actina (VALIENTE et al., 2016; CHANDRASEKARAN e LACY, 2017). Em *Streptococcus mutans*, a enzima glicosiltransferase (GTF) decompõe a sacarose nos seus monossacarídeos glicose e frutose, fazendo uso da glicose para formar os glucanos, moléculas importantes para adesão e coesão intercelular entre as bactérias cariogênicas (ZHU et al., 2015; LEMOS et al., 2019; RAINEY et al., 2019).

Ao contrário da cápsula de bactérias típicas, como em *E. coli*, pouco se conhece sobre o polissacarídeo capsular, e a função da cápsula no processo patogênico é pouco

elucidada em *Mollicutes* e em *U. diversum*, especificamente. A composição bioquímica dos polímeros capsulares de *Mollicutes* tem sido pouco estudada. As cápsulas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. dispar* são as mais conhecidas e são compostos principalmente por polímeros de 1,6-galactose, poliglucano e ácido galacturônico, respectivamente (WAITE et al., 2002). Provavelmente, a biossíntese capsular de *M. mycoides* subsp. *mycoides* está associada a uma via sintética dependente de glicose devido à presença de uma UDP-glicose 4-epimerase (GalE) e uma glicose-1-fosfato uridililtransferase (GalU) que usa glicose-1-fosfato para gerar UDP-glicose (BERTIN et al., 2013). A presença de dois genes de um transportador de açúcar foi observada no sequenciamento de *U. diversum* (transportador ABC de Ribose/galactose - gudiv\_307 e gudiv\_308) (MARQUES et al., 2016). Acredita-se que é provável que esses açúcares são capturados por *U. diversum* e são incorporados usando a glicosiltransferase para formar a cápsula.

O revestimento capsular de *U. diversum* consiste em uma camada polissacarídica de 11 a 17 nm constituída de arabinose, xilose, manose, galactose e glucose (MARQUES et al., 2016) correlacionando com a identificação pelo sequenciamento da presença da glicosiltransferase. Estas enzimas catalisam a transferência de resíduos de glicosil (açúcar) para um aceptor, tanto durante a degradação quanto durante a biossíntese de polissacarídeos, glicoproteínas e glicolípídeos (LAIRSON et al., 2008). Muitas enzimas estão associadas a produção da cápsula, e a glicosiltransferase é responsável pela adição do açúcar inicial da cadeia.

Os componentes da membrana citoplasmática de alguns ureaplasmas modulam a resposta imune principalmente as citocinas. Estes fatores, associados ou não, interferem na integridade da célula hospedeira, de tecidos e órgãos, resultando em doença (BUZINHANI, METTIFOGO e TIMENETSKY, 2007; CARDOSO et al., 2000; CHELMONSKA-SOYTA et al, 1994; MARQUES et al., 2010; MARQUES et al., 2013). Além da variação na produção e composição da cápsula polissacarídica, suas propriedades físicas e biológicas podem variar consideravelmente em micoplasmas, como em *M. genitalium* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* small colony (*Mmm*). A presença destes açúcares de *Mmm* causou a ligação ao TLR 2, aumento de IL-10 e baixos níveis de TNF- $\alpha$  em macrófagos bovinos, demonstrando propriedades anti-inflamatórias para evasão da resposta imune do hospedeiro (TOTTÉ et al., 2015). Em *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type (*M. mycoides* SC), observou-

se que Vmm é uma lipoproteína de fase variável, localizada na superfície celular. Nesse estudo, supostamente a camada capsular limitou a acessibilidade das proteínas de membrana, impedindo assim os anticorpos de se ligarem a Vmm (PERSSON et al., 2002).

É relevante determinar a importância das citocinas envolvidas na pré-implantação do embrião e quando agem na infecção por *U. diversum*, uma vez que ambiente alterado pós-fertilização pode influenciar o desenvolvimento embrionário. A interferência no ambiente nutricional do blastocisto por agentes infecciosos é crucial para este contexto. Ureaplasmas estão dentre os micro-organismos que, *in vivo*, têm acesso ao colo do útero ou até mesmo ao embrião. Desta maneira podem causar a morte embrionária por alteração do ambiente materno ou através de danos diretos ao embrião (BRITTON et al., 1987; LEWANDOWSKA-SABAT et al., 2013).

### 3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a variabilidade genética e imunoinformática do gene da glicosiltransferase de *U. diversum* e sua relação com a constituição e antigenicidade e imunogenicidade do polissacarídeo capsular.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Detectar, purificar e sequenciar o gene da glicosiltransferase em isolados clínicos e uma cepa de referência de *U. diversum*.
- Identificar a variabilidade genética e a presença de polimorfismos pelo alinhamento das sequências em isolados clínicos e uma cepa de referência de *U. diversum*.
- Avaliar as propriedades imunobiológicas das sequências do gene da glicosiltransferase em isolados clínicos e uma cepa de referência de *U. diversum* por meio de ferramentas de bioinformática.
- Extrair, purificar, quantificar e avaliar a composição do polissacarídeo capsular de diferentes cepas de *Ureaplasma diversum* em comparação com a cepa de referência.
- Avaliar a produção de anticorpos policlonais em camundongos Balb/c após a exposição ao polissacarídeo capsular de *U. diversum*, pela metodologia de ELISA indireto.
- Avaliar a proliferação linfocitária em células de sangue periférico de bovinos após a exposição ao polissacarídeo capsular de *U. diversum*, pelo ensaio de CFSE.
- Avaliar a antigenicidade do polissacarídeo capsular em macrófagos e neutrófilos de sangue periférico de vacas pela expressão gênica de marcadores inflamatórios e dosagem do óxido nítrico.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Estirpes bacterianas e condições de cultivo

Foram utilizadas a cepa de referência de *U. diversum* ATCC® 49782 e 52 isolados clínicos obtidos de coleta de *swab* vulvovaginal do Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As amostras de ureaplasma foram obtidas de coletas de material clínico de bovinos em diversas propriedades em diferentes estados brasileiros, conforme tabela abaixo. Os micro-organismos foram inicialmente cultivados em 2 mL de meio UB a 37 °C e expandidos para 10 mL do caldo (RHUNKE, 1994). Na fase de crescimento logarítmico (com base em mudança colorimétrica), as culturas foram centrifugadas a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C, o *pellet* foi homogeneizado em 2 mL de PBS e as suspensões armazenadas a -20 °C até a extração do DNA.

**Tabela 02** – Estados brasileiros de origem dos isolados de *U. diversum*

Fazenda	Estado	Cepa
1	São Paulo	A203
	São Paulo	59
	São Paulo	64
2	São Paulo	GOTA
	São Paulo	93
	São Paulo	94
	São Paulo	95
	São Paulo	98
	São Paulo	100
	São Paulo	102
	São Paulo	102
3	São Paulo	72.1
	São Paulo	72.2
	São Paulo	73
	São Paulo	84
4	São Paulo	5 T
	São Paulo	7 T
	São Paulo	10 T
	São Paulo	12T
	São Paulo	13 T
	São Paulo	16 T
5	São Paulo	S1
	São Paulo	S6
	São Paulo	S7
	São Paulo	S8

6	Mato Grosso do Sul	805
	Mato Grosso do Sul	9653
7	Bahia	34
	Bahia	35
	Bahia	37
	Bahia	78
	Bahia	81
	Bahia	83
	Bahia	84.1
	Bahia	84.2
	Bahia	89.1
	Bahia	89.2
	Bahia	BA78
8	Bahia	47
	Bahia	51
	Bahia	52
	Bahia	54
	Bahia	55
	Bahia	56
	Bahia	59
9	Bahia	234
	Bahia	239
	Bahia	249
10	Bahia	111
	Bahia	133
	Bahia	148
	Bahia	174
	Bahia	198

---

#### 4.2 Análise de distribuição e diversidade gênica da glicosiltransferase (UD216) em isolados clínicos

Primeiramente, foi realizada a análise de distribuição do gene UD216 entre os isolados clínicos. A extração de DNA das cepas de *U. diversum* foi realizada pelo *kit* Macherey-Nagel e pelo método de extração descrito por FAN et al. (1995) com algumas modificações, para comparação da quantidade de DNA obtida entre os métodos. As amostras foram submetidas à metodologia de PCR específica para confirmação da espécie, utilizando os *primers* UD3 e UD4 (CARDOSO et al, 2000). Como ainda não foram descritos na literatura *primers* específicos para o gene de interesse (UD216) de *U. diversum*, foram desenvolvidos exclusivamente para o presente estudo. Os iniciadores para amplificação do gene foram obtidos com base na sequência nucleotídica genômica de *U. diversum* ATCC49782 depositada no GenBank sob número de acesso CP009770 e com o auxílio dos *web-sofwares* Reverse Complement (STOTHARD, 2000) e IDT

(Integrated DNA Technologies). O DNA extraído da cepa de referência ATCC 49782 foi utilizado como controle positivo das reações. As seguintes condições foram testadas: concentração de *primer*, concentração de MgCl<sub>2</sub>, concentração da enzima Taq polimerase e quantidade de DNA. Também foram testadas diferentes temperaturas de anelamento entre 53 e 58 °C (variações de 0,5°C). Em seguida, o DNA da cepa ATCC (como controle positivo) e dos isolados foram submetidos a PCR para o gene da glicosiltransferase. Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 2,5 µl de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200mM em pH 8,4), 10 pmol de cada “primer”, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56,5 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, um ciclo final de 72 °C por 10 minutos e 4 °C por 10 minutos. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C, até o momento da eletroforese. Os iniciadores utilizados estão apresentados na tabela 1. Os produtos das PCRs foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz ultravioleta após a adição de brometo de etídio a 0,5 µg/ mL.

Os amplicons foram purificados com lavagens com isopropanol 65% e etanol 70% e ajustou-se a concentração ideal de DNA para o sequenciamento dos mesmos. Os amplicons alvo foram sequenciados para a análise da variabilidade genética. Estes foram enviados à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genomas e Proteomas. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o ABI 3730 DNA Analyser, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456).

**Tabela 03** - Iniciadores utilizados para identificação do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) de *U. diversum*

Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Ta (°C) <sup>a</sup>
UD216F	ATGTTATTATCAATTCTATTTTCATG	56,5
UD216R	ACGGTTTTGATATTTCTTTACA	

Nota: <sup>a</sup> Ta (°C): Temperatura de anelamento dos iniciadores em graus Celsius.

As sequências foram obtidas em formato de cromatograma e comparadas à existente no GenBank, por meio da verificação de similaridades pelo programa BLAST (BENSON et al., 2009). As comparações foram realizadas utilizando o Programa MEGA-X (“Phylogenetic and molecular evolutionary analyses - MEGA version 4.1”) (TAMURA et al., 2007; TAMURA et al., 2021). O alinhamento dos nucleotídeos foi realizado pelo método Clustal-W (THOMPSON et al., 1997). As sequências alinhadas foram reamostradas com “bootstrap” de 1.000 e as árvores foram construídas pelo método de *neighbor-joining*, com matriz de distância Tajima-Nei.

### **4.3 Análises *in silico* do gene da glicosiltransferase (UD216) em cepas de *U. diversum***

#### *4.3.1 Análises preliminares in silico do gene da glicosiltransferase (UD216) da cepa ATCC de U. diversum*

Inicialmente, a sequência do gene da glicosiltransferase (UD216) da cepa ATCC de *U. diversum*, (número de acesso no GenBank: CP009770), foi analisada pelos *web-software* PSORTb versão 3.0.2 (NAKAI, HORTON, 1999; YU et al., 2010), TOPCONS versão 2.0 (TSIRIGOS et al., 2015), TopPred versão 1.10 (CLAROS, VON HEIJNE, 1994), TMHMM Server versão 2.0 (KROGH et al., 2001; SONNHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998), DAS (CSERZO et al., 2002), JPred 4 (DROZDETSKIY et al., 2015) para avaliar a sua localização celular (extracelular, transmembrana, citoplasmática) e predições de estruturas secundárias. Também foi analisada pelo *web-software* IEDB Analysis Resource (*Immune Epitope Database and Analysis Resource*) versão 2.13.1 para regiões com *beta-turn* (CHOU, FASMAN, 1978), acessibilidade (EMINI et al., 1985) e predição de epítomos lineares para células B (através do Bepipred) (ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006; LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006; PONOMARENKO; BOURNE, 2007). Finalmente, foi analisada usando BLAST e DELTA BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificar regiões de homologia e o alinhamento das regiões homólogas foi gerado com Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011; MCWILLIAM et al., 2013; LI et al., 2015). O programa SAPS (Statistical Analysis of Protein) (BRENDDEL et al., 1992; GOUJON et al., 2010; MCWILLIAM et al., 2013; LI et al., 2015) foi utilizado para avaliar propriedades da sequência usando os parâmetros *default*. Para avaliar características físico-químicas foi

utilizado o programa ProtParam (GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., 2005).

#### 4.3.2 *Imunoinformática da sequencia do gene da glicosiltransferase (UD216) dos isolados clínicos e da cepa ATCC de U. diversum*

##### 4.3.2.1 Mapeamento de epítomos de linfócitos B de bovinos e predição de antigenicidade

O servidor CBTOPE v1.0 (disponível em <http://crdd.osdd.net/raghava/cbtope/>) foi usado para prever epítomos descontínuos (conformacionais) de linfócitos B. Um *threshold* de -0,3 foi usado, e na escala de probabilidade (0-9) aminoácidos com valores maiores que quatro foram considerados epítomos conformacionais. Este servidor possui um conjunto de dados com cadeias de proteínas não redundantes que consistem em anticorpos que reagem com resíduos de epítomos de células B (GAETI et al., 2014). Para prever epítomos contínuos, as sequências foram analisadas no software BepiPred v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), um preditor de epítomos derivados de estruturas cristalográficas. Aminoácidos com *thresholds* maiores que 0,5 foram considerados epítomos lineares de células B (JESPERSEN et al., 2017). As sequências também foram avaliadas com o servidor VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), que permite classificar antígenos sem usar o alinhamento das sequências. Todas as proteínas previstas para escores acima do *threshold* (0,5) foram classificadas como antigênicas.

##### 4.3.2.2 Mapeamento de epítomos e identidade de linfócitos TCD8<sup>+</sup> de bovinos

A previsão da ligação de MHCI a peptídeos com 9 aminoácidos, foi realizada usando o servidor NetBoLApan v1.0, acessado em (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetBoLApan/>). Um limite padrão de 0,5% foi usado para ligações fortes e 2% para ligações fracas. O número de ligações fortes e fracas foi descrito e expresso em números absolutos. O NetBo-LApan v1.0 avalia um conjunto de dados de peptídeos com afinidade de ligação a moléculas de BoLA (NIELSEN et al., 2018). Os alelos usados neste estudo foi BoLA-6\*01301 (HD6), BoLA-2\*01201 (T2A), BoLA-3\*00201 (JSP), BoLA-1\*02301 (D18.4), BoLA-3\*00101 (AW10), BoLA-6\*04101 (T2B), BoLAT2C e Bola – T5. Neste conjunto de alelos existem representantes de três subespécies de

bovinos (*Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus* e o híbrido *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), sendo alguns deles de importância em atividades pecuárias (HANSEN et al., 2014).

#### 4.3.2.3 Previsão de secreção e localização subcelular

Predições de vias de secreção clássica e identificação de peptídeo sinal foram realizadas no servidor SignalP v5.0 disponível em (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e DOLOP, um servidor que usa características de peptídeo sinal para prever lipoproteínas (<https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>). O Servidor da web SecretomeP v2.0 ([http://www.cbs.dtu.dk/services/Secretome P](http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP)) foi usado para prever vias de secreção não clássicas. Valores previstos iguais ou superiores a 0,5 (*threshold*) foram considerados indicativos de secreção. As sequências também foram submetidas à previsão de localização subcelular no software PSORTb v3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>) usando configurações sugeridas para *Mycoplasma spp.* TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) foi usado para verificar a presença de loops transmembrana.

#### 4.3.2.4 Investigação de parâmetros físico-químicos das sequencias de aminoácidos

As propriedades físico-químicas das sequencias, incluindo índice alifático, peso molecular, GRAVY e índice de instabilidade foram preditas no ProtParam usando o servidor ExPASy em (<http://web.expasy.org/protparam/>). A solubilidade de peptídeos heterólogos após a superexpressão em *E. coli* foi previsto pelo servidor SOLpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) e Protein-Sol, (acessado em <https://protein-sol.manchester.ac.uk/>).

#### 4.3.2.5 Refinamento de propriedades relacionadas à imunomodulação e expressão em um sistema heterólogo

Antígenos de *U. diversum* foram classificados de acordo com dois parâmetros: (i) parâmetros indesejáveis para uso em medidas profiláticas e imunodiagnósticas; no qual resultados de previsão para similaridade com proteomas bovinos foram avaliados, número de epítomos conformacionais e lineares para linfócitos B, antigenicidade, número de epítomos de linfócitos T (ligantes de alelos BoLA); (ii) parâmetros

indesejáveis para expressão em *E. coli*; em que foram previstos parâmetros relacionados à ausência de sinalização para excreção por vias clássicas ou não clássicas, tamanho da proteína, índice de estabilidade, GRAVY, solubilidade e presença de alças transmembrana.

#### **4.4 Cultivo de *U. diversum*, detecção, extração e quantificação de carboidratos do polissacarídeo capsular**

##### *4.4.1 Crescimento e expansão da cultura de ureaplasma*

Baseando-se nos agrupamentos formados pela proximidade filogenética após o sequenciamento do gene codificador da glicosiltransferase das amostras de *Ureaplasma diversum*, uma amostra de cada grupo formado (n=6) (10T, 72.1, 234, GOTA, 174 e 805) e a cepa de referência de *U. diversum* ATCC<sup>®</sup> 49782 foram cultivadas e expandidas ao volume final de 2 litros. Os microrganismos foram inicialmente cultivados em 2 mL de meio UB a 37 °C (RUHNKE e ROSENDAL, 1994). Na fase de crescimento logarítmico (com base em mudança colorimétrica), aproximadamente após 12 horas de cultivo, cada cultura foi expandida, sucessivamente e respeitando os períodos de crescimento para 20 mL, 200 mL até 2 litros. Após 3 dias de cultivo e expansão, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 1 hora para formação do *pellet* celular. Todas análises posteriores foram realizadas usando essas amostras (n=7).

##### *4.4.2 Presença de cápsula*

A presença de cápsula nas espécies de ureaplasma foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão, como descrita por Almeida e Rosenbusch (1991), com modificações. Os isolados foram primeiramente cultivados em 50 mL de meio UB. Os ureaplasmas foram sedimentados por centrifugação a 20.600 g por 30 min, sendo o sedimento homogeneizado em tampão cacodilato 0,01 M com 3% de glutaraldeído e 0.2% de vermelho de ruteno (pH 7,4). Os microrganismos foram lavados cinco vezes com tampão cacodilato 0.05 M, fixados com 1% de tetróxido de ósmio, desidratados com gradiente de etanol e tratado com resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA). Os cortes ultrafinos foram analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1010.

#### 4.4.3 Extração do polissacarídeo capsular

O protocolo utilizado para extração da cápsula de *Ureaplasma diversum* foi baseado em Rurangirwa et al. (1987), com modificações. A cápsula foi extraída exclusivamente do *pellet* celular para minimizar os riscos de contaminação com os polissacarídeos derivados do meio de cultura. As células de ureaplasma de 2 litros de cultura das amostras 10T, 72.1, 234, GOTA, 174, 805 e ATCC 49782 foram coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 1 hora e o sobrenadante descartado. O *pellet* celular foi lavado duas vezes em PBS e homogenizado em 10 mL com o mesmo diluente. Um volume igual de fenol foi adicionado e a mistura foi incubada a 60° C por 30 minutos para desnaturar e remover o material proteináceo. As fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação a 5000 rpm por 1 hora. A fase aquosa (contendo CPS e ácidos nucleicos) foi removida e o material interfacial e orgânico (contendo a maior contaminação protéica) foi descartado. A extração com fenol foi repetida na fase aquosa até que esta aparentasse transparente. Adicionou-se à fase aquosa 20 µL de DNase I e II (2500 U/mL) e 100 µg de RNase A, seguido de incubação a 37°C por 18 horas. Após este período, adicionou-se SDS para uma concentração final de 0,5%, e 100 µg de proteinase K e incubado a 45°C por 24 horas. No dia seguinte, um volume igual de fenol/clorofórmio foi adicionado e, após homogeneização, as fases foram separadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi retida e adicionou-se um volume de clorofórmio igual ao do extrato, seguido por centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos. O polissacarídeo capsular foi precipitado pela adição de 1/10 de volume de acetato de sódio a 3 M e adição de um volume 4 vezes maior de etanol absoluto. A mistura foi mantida em repouso *overnight* a 4°C. No dia seguinte foi centrifugada a 3500 rpm por 50 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado em 100 µL de água destilada, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

#### 4.4.4 Quantificação de carboidratos do polissacarídeo capsular

A quantidade de carboidratos no extrato foi mensurada pela metodologia de fenol-ácido sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956). Uma curva padrão foi obtida utilizando glicose como referência para posterior estimativa da quantidade de açúcares total das amostras 10T, 72.1, 234, GOTA, 174, 805 e ATCC 49782. Foram preparadas soluções padrão de glicose por diluições seriadas (a partir de uma solução a 0,1mg/mL)



nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , além do branco usando água destilada. Para cada amostra a determinação foi realizada em triplicata. Uma alíquota de 0,05 ml das soluções a serem analisadas foi transferida para tubos de ensaio de vidro, adicionado de 0,15 mL de água destilada, 0,2 mL de solução de fenol 5% e agitado suavemente. Em seguida adicionou-se 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado diretamente sobre a amostra e homogeneizado suavemente. Em seguida, a amostra foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente para o resfriamento da solução. Após o preparo de todos os padrões e amostras, foram realizadas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm, em cubetas de quartzo, para gerar a curva de calibração e quantificar cada amostra.

#### 4.4.5 Avaliação da composição do polissacarídeo capsular

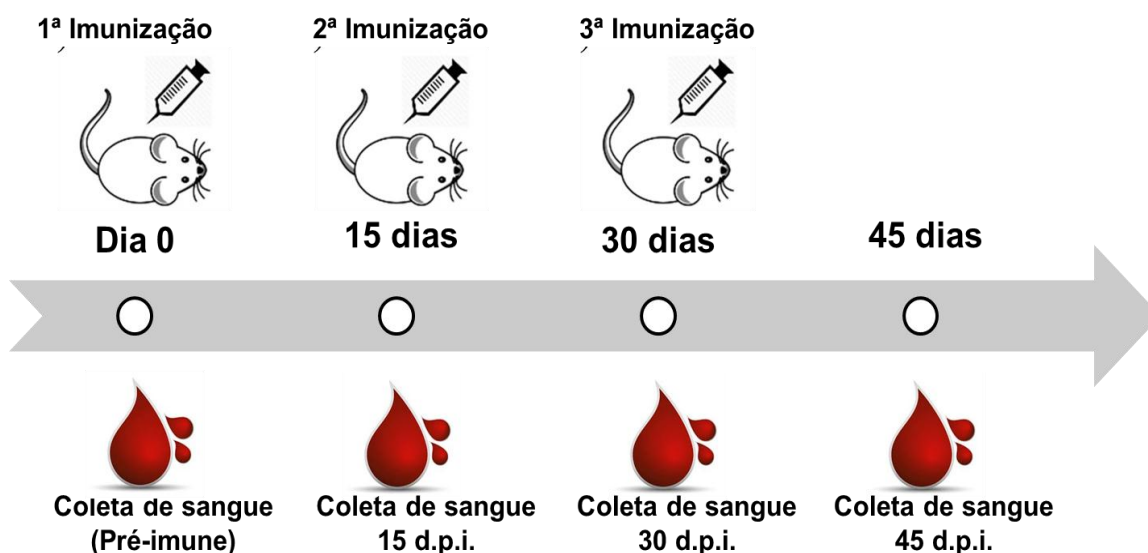
Para avaliar a composição do monossacarídeo, cada polissacarídeo foi hidrolisado com 300  $\mu\text{L}$  de 2 mol/L de ácido trifluoroacético, a 100 °C por 8 horas. As amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio e, em seguida, dissolvidas em 300  $\mu\text{L}$  de água e o pH foi elevado para 8 por adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . As amostras foram reduzidas com  $\text{NaBH}_4$  à temperatura ambiente por 4 horas, em seguida, a resina catiônica foi adicionada para remover os sais, as amostras foram secas sob corrente de nitrogênio e seguido pelo processo de dissolução/secagem em metanol (500  $\mu\text{L}$ , x 3) para remover o resíduo borato. Os produtos de alditol foram acetilados pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de anidrido acético-piridina (1:1, v/v), mantidos *overnight* em temperatura ambiente. Metanol (200  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado para interromper a reação e as amostras foram secas sob corrente de nitrogênio. Os acetatos de alditol foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS — Varian, modelo Saturn 2000) com analisador Ion Trap. A cromatografia foi desenvolvida em coluna capilar de sílica fundida DB-225-MS (30 m, 0,25 mm, d.i. e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme). As temperaturas foram: injetor 250 °C e forno programado de 50 °C a 220 °C a 40 °C/min. Os monossacarídeos (como acetatos de alditol) foram identificados com base em seus espectros de massa na ionização de elétrons (EI, 70eV) e padrões autênticos (Sigma-Aldrich).

## 4.5 Avaliação da imunogenicidade do polissacarídeo capsular

### 4.5.1 Produção de anticorpos policlonais

O experimento com camundongos foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia - Instituto Multidisciplinar de Saúde, Campus Anísio Teixeira (processo número: CEUA-IMS/CAT-UFBA - 085/2019). A indução da produção de anticorpos foi realizada com as amostras 10T, 72.1, 234, GOTA, 174, 805 e ATCC 49782 foram inoculadas em camundongos Balb/c (seis a dez semanas de idade), mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*. Um grupo de 8 camundongos não foram inoculados constituindo o grupo controle (pré-imune). Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados por via subcutânea (FIOCRUZ, 2008), com 0,5 µg de CPS em solução salina usando adjuvante incompleto de Freund (SigmaAldrich®) (v/v). Duas inoculações subsequentes com quantidades iguais de polissacarídeo capsular e adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich®) foram realizadas em intervalos de duas semanas. A coleta de sangue pós-imunizações foi realizada a cada quinze dias e os soros obtidos foram armazenados a -20 °C (Figura 03)

**Figura 3** – Modelo experimental da produção de anticorpos policlonais.



**Legenda:** Os anticorpos policlonais foram produzidos pela imunização dos camundongos Balb/c com o polissacarídeo capsular das amostras ATCC 49782, 10T, 72.1, 234, GOTA, 174, 805.

#### *4.5.2 Avaliação da cinética de produção de anticorpos policlonais antipolissacarídeo capsular*

A metodologia de ELISA indireta foi utilizada para avaliar a cinética de imunização (títulos de antipolissacarídeo capsular). Os ensaios ELISA foram realizados revestindo placas de 96 poços (Corning COSTAR) com 50, 100 e 200 ng dos diferentes polissacarídeos capsulares em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por 16 horas a 4 °C, em câmara úmida. Em seguida, a placa foi lavada cinco vezes com PBS - Tween 20 (0,05%). Ligações inespecíficas foram bloqueadas por uma hora a 37 °C com 10% de leite desnatado em PBS. As placas foram lavadas com PBS - Tween 20 (0,05%) e os soros de camundongos com anticorpos anti-polissacarídeo capsular foram adicionados em diferentes diluições (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) seguido de anticorpo secundário conjugado com peroxidase (goat anti-mice IgG, HRP conjugate -Invitrogen) diluído 1:2000 em PBS contendo 5% de leite desnatado. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS-T e adicionado 100 µL de solução de TMB (Novex, Life Technologies) por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido clorídrico 1 N, e a absorbância foi lida a 450 nm usando um leitor de microplaca.

### **4.6 Ensaios de antigenicidade dos polissacarídeos capsulares**

#### *4.6.1 Coleta de sangue periférico bovino*

A coleta do sangue periférico bovino foi realizada por médico veterinário de acordo com as disposições de ética para pesquisa animal. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e aprovado pelo protocolo nº16/2017. Amostras de 70 ml de sangue periférico foram coletadas da veia jugular de 10 vacas clinicamente saudáveis em tubos de coleta de sangue (BD Vacutainer®) com EDTA, através de punção venosa (GONDAIRA et al., 2015). As amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente, transportadas ao laboratório e processadas em até 2 horas após, para o ensaio de proliferação de linfócitos e de resposta de monócitos/macrófagos.

#### *4.6.2 Ensaio de proliferação de linfócitos*

Concentrações determinadas de PBMC bovinos foram analisadas para a proliferação de linfócitos totais. As células foram marcadas com Carboxy

Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester (CFSE), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Incubou-se por 20 min a 37 ° C e 5% de CO<sub>2</sub> e as células foram então centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em meio RPMI-1640 completo. O número de células foi ajustado para 1x10<sup>6</sup> células/mL, dispensadas em triplicata placas de cultura de células Costar de 24 poços (Corning) e estimuladas com o exopolissacarídeo capsular das amostras 10T, 72.1, 234, GOTA, 174, 805 e ATCC 49782. Concanavalina A (ConA, Sigma-Aldrich) a 5,0 µg / mL e PBS pH 7,4 foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após 72 horas de exposição, as células foram transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 3500 rpm por 7 minutos e ressuspensas a 200 µL de solução de fixação por 20 minutos ao abrigo da luz a 4 °C para avaliação em citômetro de fluxo. Foram adquiridos 50000 eventos, utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A análise foi realizada pelo software FlowJo (versão 7.6.5. TreeStar, OR, USA).

#### 4.6.3 Avaliação de resposta imunológica in vitro de monócitos/macrófagos

##### 4.6.3.1 Isolamento de monócitos bovinos

O sangue periférico foi diluído na proporção 1:1 com PBS 1x; (pH 7,4) e 10 mL da diluição foram adicionadas sobre 3 mL de Ficoll -Histopaque (densidade: 1,0771 g/mL, Sigma-Aldrich, Brasil) formando a barreira do Ficoll -Histopaque. O material foi centrifugado a 2500 x g à temperatura ambiente por 20 minutos e as células mononucleares, presentes na interface Ficoll/plasma, foram removidas e lavadas duas vezes com PBS em rotação 1250 x g por 10 minutos. Para isolamento dos monócitos as células mononucleares foram ressuspensas em uma solução A (5 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco, Brasil)) e esta solução foi lentamente adicionada a 5 mL de solução B (5 mL de RPMI + 4,75mL de Percoll + 0,325 mL de PBS 10X). Esta mistura foi centrifugada por 30 minutos, 1500 x g, 20°C. Os monócitos presentes na interface formadas entre as soluções foram coletados e o *pellet* contendo os linfócitos foi descartado. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, a viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0,1%. Após contagem a concentração celular foi ajustada para 4x10<sup>5</sup> célula/mL por meio da adição PPMI suplementado (10% de soro fetal bovino. 100 U/mL de penicilina e bicarbonato) (CRUZ, 2010). As culturas foram utilizadas 24 horas após o isolamento. A

diferenciação de monócitos em macrófagos aderentes foi confirmada por microscopia (ALMEIDA et al., 1992; GONDAIRA et al., 2015).

#### 4.6.3.2 Inoculação de macrófagos com os polissacarídeos capsulares

Macrófagos bovinos foram incubados por 2 e 6 horas com concentrações específicas do polissacarídeo capsular extraído de 7 cepas de *U. diversum* (10T, 72.1, 234, GOTA, 174, 805 e ATCC 49782). Como controle negativo outra suspensão de macrófagos foi exposta ao PBS (1x). O controle positivo consistiu na exposição de 100µg/mL de LPS em outra suspensão de macrófagos. Após o cultivo dos macrófagos, o sobrenadante dos poços das microplacas foi destinado à dosagem de óxido nítrico. As células foram lavadas, removidas da placa de cultivo, homogeneizadas em RNeasy<sup>TM</sup> e congeladas a -70 ° C para posterior extração de mRNA (LEWANDOWSKA-SABAT, 2013).

#### 4.6.3.3 Extração de mRNA de macrófagos bovinos

O mRNA das células foi extraído utilizando o PicoPure RNA isolation kit, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e incubadas com 1,0 mL de Trizol à temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Duzentos microlitros de clorofórmio foram adicionados, incubado a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação e separação das fases, 600 µL da fase aquosa (contendo o mRNA) foi coletado e, sobre esta fase, foi adicionado igual volume de álcool 70%. A amostra preparada foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um microtubo. Após centrifugação e descarte do líquido drenado a coluna foi lavada com tampões de lavagem. Posteriormente a coluna foi transferida para outro microtubo e foi adicionando 30 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase (eluyente). A coluna spin foi centrifugada, descartada e o mRNA eluído foi quantificado em NanoDrop e imediatamente processado para síntese de cDNA.

#### 4.6.3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada por meio da reação de transcriptase reversa utilizando o *kit* SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Aos mRNAs foram adicionados a solução do mix A (1 µL de oligo dT, 1 µL de dNTP (10

mM) e água livre de RNase para um volume final de 12 µL) e incubadas a 60 °C por 1 minuto seguido de centrifugação de 14000 rpm por 30 segundos. Posteriormente foi adicionado o mix B (1 µL de tampão 10X First-Strand, 2 µL de DTT, 1 µL de RNaseOUT™, 1 µL de SuperScript™ III RT) e incubadas em termociclador a 50 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -70 °C para posterior análise da expressão gênica.

#### 4.6.3.5 Expressão gênica de marcadores inflamatórios

A partir do o cDNA sintetizado, foi realizado PCR quantitativa (qPCR), com *primers* específicos para avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1β e TNF-α, dos TLRs 2 e 4 (GARCIA et al., 2015) e iNOS (TESFAYE et al., 2006). A reação foi realizada por meio do StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com SYBR Green (Qiagen-SABioscience, Brasil) e utilizando o programa recomendado pelo fabricante. A curva de Melting foi avaliada ao final da reação para observar a especificidade da amplificação. Os dados foram analisados pelo método comparativo ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH (GARCIA et al., 2015).

#### 4.6.3.6 Dosagem de óxido nítrico

Para a dosagem do NO foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (STUEHR e NATHAN, 1989; TSIKAS, 2007), que consiste na detecção de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Foi adicionado em uma microplaca de 96 poços 50µl do sobrenadante de cada cultura (padrões, controles e amostras), adicionados a 0,1% de solução de reagente de Griess [50 µL de N- (1-naftil) etilenodiamina 3,9 mM em ácido fosfórico a 5% (v / v)] e incubados no escuro em temperatura ambiente por 10 minutos. A solução de sulfanilamida (1% em ácido fosfórico) foi adicionada à mistura e a absorbância foi medida a 540 nm por um leitor de microplaca (iMark™ Microplate Absorbance Reader Bio-Rad). Soluções padrão de nitrato de sódio (0,1 mM) foram usadas para construir uma curva padrão para determinar as concentrações reais nas amostras. A absorbância das diferentes amostras foi comparada com a curva-padrão de  $\text{NaNO}_2$  cujos valores utilizados para cálculo foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 µM.

#### **4.7 Tratamento Estatístico**

A análise estatística foi obtida utilizando o programa GraphPad-Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA-USA) utilizando os testes estatísticos adequados ao estudo. Os critérios de normalidade foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Um teste de análise de variância (ANOVA) unilateral com o teste de Bonferroni foi usado nos casos em que os dados foram normalmente distribuídos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado caso esses dados não preenchessem os critérios de normalidade. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). O valor da probabilidade (p) foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$  utilizando um intervalo de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise de distribuição e diversidade gênica da glicosiltransferase (UD216) em isolados clínicos

#### 5.1.1 Amplificação do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) das amostras de isolados clínicos de *U. diversum*

Verificou-se que 56,5 °C foi a temperatura ótima de amplificação para melhor amplificação do gene alvo UD216, respectivamente. Os *primers* utilizados neste estudo apresentaram desempenho satisfatório nas PCRs, gerando produtos que podem ser diferenciados em gel de eletroforese (figura 04).

**Figura 4.** Eletroforese dos produtos de PCR do gene UD216



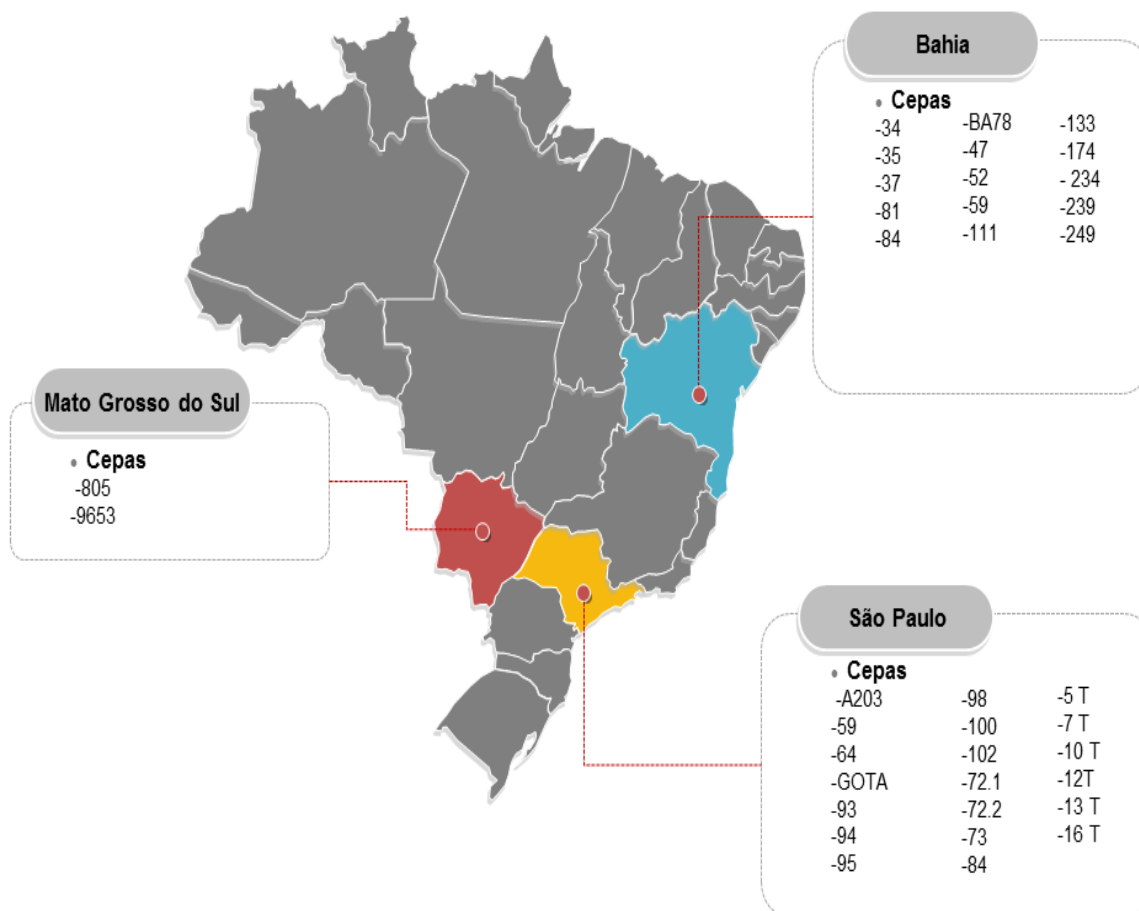
**Legenda.** Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de reações de PCR para o gene da glicosiltransferase (UD216). Marcador de peso molecular de 100 pb (coluna 1), controle negativo (coluna 2), glicosiltransferase com 924 pb (coluna 3).

#### 5.1.2 Distribuição da glicosiltransferase em isolados de *U. diversum*

Após a PCR das 52 amostras de *U. diversum*, 69% (n=36) foram positivas para o gene UD216. As duas amostras do estado do Mato Grosso do Sul e 83% das amostras do estado de São Paulo (n=24) foram positivas, assim como 60% das amostras originadas do estado da Bahia (n=25). A distribuição das amostras positivas foi homogênea em todos os estados de origem dos isolados (Figura 05).



**Figura 5.** Distribuição do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) no Brasil



**Legenda.** Distribuição do gene codificador da glicosiltransferase (UD216) entre os isolados de *U. diversum* testados com PCR convencional em diferentes estados brasileiros.

## 5.2 Análise intra-específica do gene codificador da glicosiltransferase (UD216)

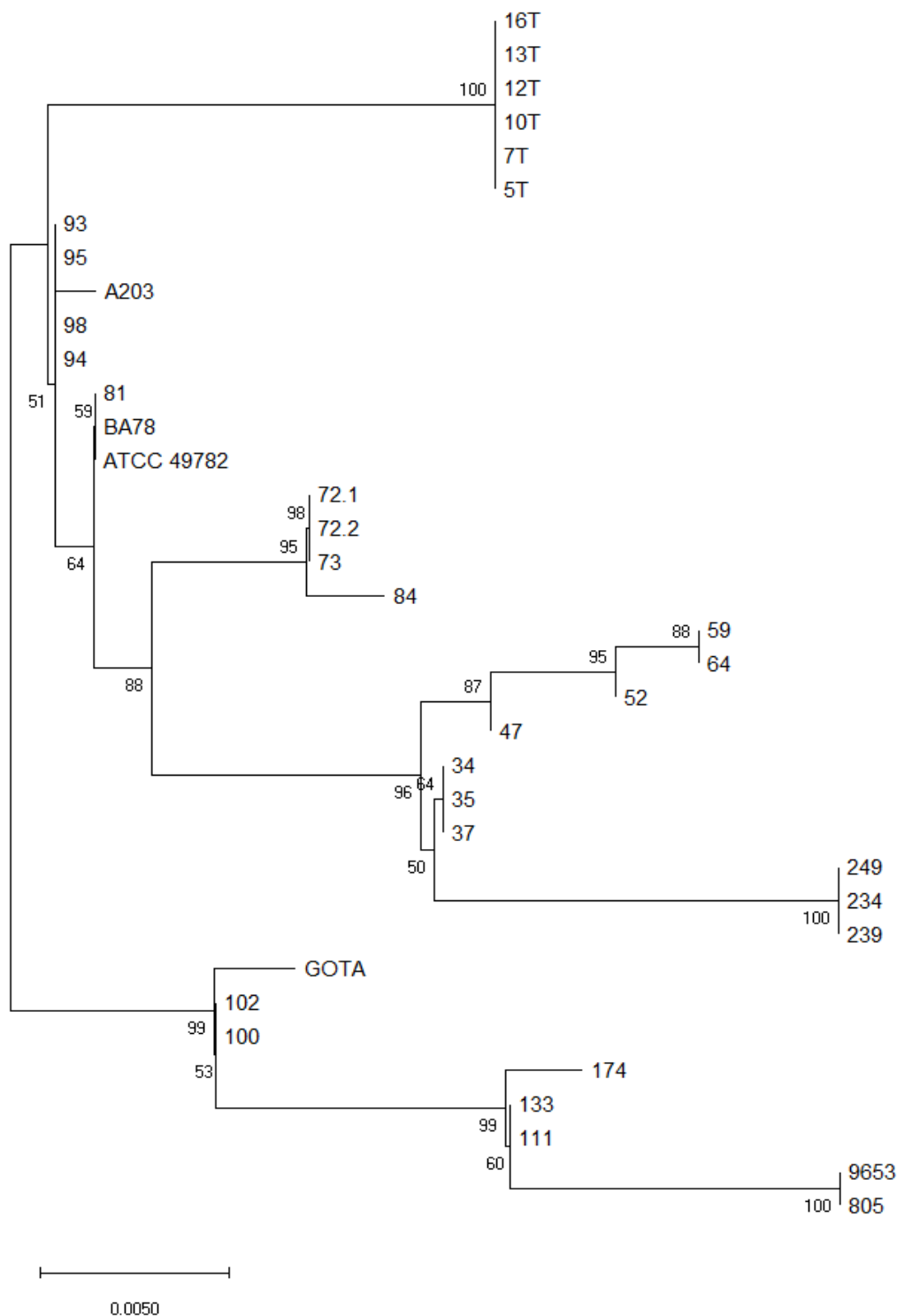
O gene UD216, apresentou polimorfismos, inserções e deleções em algumas regiões. A sequência completa do gene codificador da glicosiltransferase da cepa de referência de *U. diversum*, (número de acesso no GenBank: CP009770), foi utilizada para as comparações e alinhamento usando a ferramenta de alinhamento de sequência múltipla ClustalW (tabela 4). Esta sequência contém 264 nucleotídeos. Os polimorfismos nos nucleotídeos (Adenina, A; Citosina, C; Guanina, G; Timina, T) foram identificados com base em sua posição no gene UD216 e indicados como Y = T / C, R = A / G, M = A / C, K = G / T, W = A / T e S = G / C (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, IUBMB). A transversão A/T (W) foi encontrada na maioria dos isolados, principalmente entre as posições 140 e 155. Transversões foram observadas em 131 posições de nucleotídeos, enquanto as transições foram observadas

em 41 posições de nucleotídeos. As transições A/G (R) e T/C (Y) foram observadas em 36 e 5 posições de nucleotídeos cada, respectivamente. A transversão A/T (W) foi a mais detectada, em 104 posições de nucleotídeos. As transversões A/C (M) e G/T (K) foram observadas em 13 e 12 posições de nucleotídeos, nessa ordem. A transversão G/C (S) foi observada apenas em 3 posições de nucleotídeos.

A árvore filogenética (Figura 6) demonstra a proximidade genética entre isolados coletados nas mesmas propriedades. Em alguns ramos da árvore, com confiabilidade maior que 98%, foram formados diferentes grupos. O grupo 1 compreende as amostras obtidas de sêmen congelado em um centro de inseminação artificial (16T, 13T, 12T, 10T, 7T, 5T) do estado de São Paulo; grupo 2 são amostras coletadas na mesma propriedade no estado de Mato Grosso do Sul (9653 e 805). As amostras isoladas de duas propriedades diferentes no estado de São Paulo formaram dois grupos diferentes contendo amostras das mesmas propriedades (grupo 3: GOTA, 100 e 102; grupo 4: 72.1, 72.2, 73). As amostras coletadas no estado da Bahia formaram também dois grupos distintos (grupo 5: 249, 234 e 239; grupo 6: 174, 133 e 111). Os resultados obtidos dos respectivos sequenciamentos foram também confrontados com a produção e tipificação dos polissacarídeos produzidos por esses microrganismos.



**Figura 06** – Árvore filogenética obtida com o sequenciamento do gene UD216 de *Ureaplasma diversum*.



**Legenda** – Árvore filogenética obtida com o sequenciamento do gene UD216 (5'- 3') dos isolados de *U. diversum* e da cepa de referência ATCC 49782 de *U. diversum* depositada no GenBank. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “Bootstrap” de 1.000 repetições.

### 5.3 Análises *in silico* do gene da glicosiltransferase (UD216) em isolados de *U. diversum*

#### 5.3.1 Análises *in silico* da sequencia depositada no GenBank do gene da glicosiltransferase (UD216) da cepa de referencia ATCC49782

A sequência da glicosiltransferase (UD216) possui 307 resíduos de aminoácidos, com peso molecular estimado de 36,2 kDa. A sequência analisada foi avaliada pelo *web-software* IEDB Analysis Resource para predições de: *beta-turn*, acessibilidade e epítomos lineares e conformacionais de células B. A tabela 5 e figura 7 apresentam a caracterização da sequência analisada. Além disso, a sequência foi avaliada pelo algoritmo SAPS, que identificou que a sequência de glicosiltransferase (UD216) não possui segmentos hidrofóbicos nem transmembranares.

**Tabela 05** - Comparação entre *softwares* para predições de peptídeo sinal e predições da topologia das proteínas de membrana descritas nesse estudo.

<i>Softwares</i>	UD 216
Psorb <sup>a</sup>	-
TMPRED <sup>b</sup>	156 <sub>in</sub> -175 <sub>out</sub> (20)
	228 <sub>in</sub> -249 <sub>out</sub> (22)
	165 <sub>out</sub> -181 <sub>in</sub> (17)
CCTOP <sup>b</sup>	22
TOPCONS	-
TopPred	In-out <sup>d</sup>
DAS	Ausência de sequência transmembrânica
TMHMM	Out <sup>c</sup>

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

<sup>b</sup> Aminoácidos inseridos na membrana (direção e tamanho).

<sup>c</sup> A proteína está localizada fora da célula.

<sup>d</sup> A proteína está direcionada a partir da membrana para o meio extracelular.

**Figura 07** - Predições pelo web-software IEDB Analysis Resource e CBTOPE.

```
>UD 216
MLLSILFHVS KNANHLQANL SGFLDFVLKH PKQVELLVD DASDSQVLRI
VKQTIDPSKH KIKYIYLNHQ LGHAYAYNLA TKHARGKYVW YTGSEFNVLNR
DLEDSLLKQV HEDFDVISFN LADDVNKATT AVHTTESPEM IINYWESISN
KIINRAWLVA NDISFAYGKW FPALFNFALF KNFKTWKHMD ACLLANTKQD
CVIYNIYDLL QQIKPLYQAF VNNSWKDVYN QELCYWATGI CLHTFMRQIY
KIYSNEDVDQ IKDKEQLNII QNACENALKY LQTYFSNYAS NKYVKKYQNR
LFKYFLK
```

**Legenda** - Predições de *beta-turn* (aminoácidos sublinhados), antigenicidade (itálico), acessibilidade (negrito) e epítomos lineares (marcados em cinza) e conformacionais (aminoácidos em vermelho) para células B.

### 5.3.2 Análise *in silico* da presença de epítomos para linfócitos B e T das sequências dos isolados clínicos de *U. diversum*

Os resultados da predição de epítomos de células B conformacionais e lineares das amostras sequenciadas neste estudo exibem o número de regiões em valores absolutos e a porcentagem total de aminoácidos nas regiões de epítomos. Todas as proteínas possuem epítomos conformacionais para linfócitos B, conforme demonstrado na tabela 06. O número de regiões antigênicas variou de 18 nas amostras coletadas de sêmen em uma central de inseminação artificial (5T, 7T, 10T, 12T, 13T, 16T) a 28 nas amostras de ureaplasma 805 e 9653. As proteínas com porcentagens mais baixas e mais altas de aminoácidos nas regiões antigênicas foram, respectivamente, as amostras de sêmen (22%) e as amostras 111 e 133 (27,7%). Na predição de epítomos lineares, o número de regiões antigênicas variou entre 5 (12 amostras), 6 (17 amostras) e 7 (sete amostras). As sequências com a maior porcentagem de aminoácidos nas regiões antigênicas foram 234, 239 e 249 (32,2%). Nenhuma das 36 sequências avaliadas foram previstas como antigênicas (pontuação maior ou igual a 0,5 no servidor VaxiJen).

**Tabela 06** - Predição de antígenos conformacionais e lineares de linfócitos B e predição em antígenos de *U. diversum*.

Amostra	CBTOPE				BEPIRED				(VaxiJen)
	Absol.	AA	TOTAL	%	Absol.	AA	TOTAL	%	Antigen.
<b>5T</b>	19	66	298	22,1	6	83	298	27,9	0.3917
<b>7T</b>	18	67	304	22,0	5	75	304	24,6	0.3917
<b>10T</b>	18	67	304	22,0	5	75	304	24,6	0.3917
<b>12T</b>	18	67	304	22,0	5	75	304	24,6	0.3917
<b>13T</b>	18	67	304	22,0	5	75	304	24,6	0.3917
<b>16T</b>	18	67	304	22,0	5	75	304	24,6	0.3917
<b>34</b>	23	81	307	26,4	6	95	307	30,9	0.4003
<b>35</b>	23	81	307	26,4	6	95	307	30,9	0.4003
<b>37</b>	23	81	307	26,4	6	95	307	30,9	0.4003
<b>47</b>	23	81	307	26,4	6	85	307	27,7	0.4044
<b>52</b>	23	81	307	26,4	6	94	307	30,6	0.3860
<b>59</b>	23	81	307	26,4	6	87	307	28,3	0.3978
<b>64</b>	23	81	307	26,4	6	87	307	28,3	0.3978
<b>72.1</b>	26	84	309	27,2	6	88	309	28,5	0.4447
<b>72.2</b>	26	84	309	27,2	6	88	309	28,5	0.4447
<b>73</b>	26	84	309	27,2	6	88	309	28,5	0.4447
<b>81</b>	23	77	307	25,0	6	98	307	31,9	0.3965
<b>84</b>	25	81	309	26,2	6	92	309	29,8	0.4362
<b>93</b>	23	77	307	25,0	5	86	307	28,0	0.4005
<b>94</b>	23	77	307	25,0	5	86	307	28,0	0.4005
<b>95</b>	23	77	307	25,0	5	86	307	28,0	0.4005
<b>98</b>	23	77	307	25,0	5	86	307	28,0	0.4005
<b>100</b>	24	84	307	27,4	7	90	307	29,3	0.3778
<b>102</b>	24	84	307	27,4	7	90	307	29,3	0.3778
<b>111</b>	25	85	307	27,7	7	95	307	30,9	0.3750
<b>133</b>	25	85	307	27,7	7	95	307	30,9	0.3750
<b>174</b>	24	83	307	27,0	6	86	307	28,0	0.3862
<b>234</b>	23	84	307	27,4	7	99	307	32,2	0.4082
<b>239</b>	23	84	307	27,4	7	99	307	32,2	0.4082
<b>249</b>	23	84	307	27,4	7	99	307	32,2	0.4082
<b>805</b>	28	72	306	23,5	5	72	306	23,5	0.3545
<b>9653</b>	28	72	306	23,5	5	72	306	23,5	0.3545
<b>ATCC497</b>	24	77	307	25,0	6	98	307	31,9	0.3965
<b>82</b>									
<b>A203</b>	24	79	307	25,7	6	98	307	31,9	0.3982
<b>BA78</b>	24	77	307	25,0	6	98	307	31,9	0.3965
<b>GOTA</b>	21	81	307	26,4	5	92	307	30,0	0.3790
<b>Msp5*</b>	19	-	-	45,2	5	-	-	43,3	0,5100

\* Mapeamento de epítomos de linfócitos B e previsão de antigenicidade também foram realizados para o peptídeo Msp5 ESXA\_MYCBO de *A. marginale*

Nas análises dos ligantes ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHCI) das amostras sequenciadas neste estudo, as sequencias mostraram pelo menos uma ligação para os oito alelos de antígenos de linfócitos bovinos MHCI analisados (BoLA) (Tabela 07). O número máximo de ligações estava entre os epítomos das amostras de sêmen (5T, 7T, 10T, 12T, 13T, 16T), ao alelo BoLAT2C (27 ligações). Dentre os alelos avaliados, o alelo BoLA-6\*04101 exibiu menos ligações as sequencias avaliadas.

**Tabela 07** - Predição de epítomos para linfócitos TCD8+ ligantes para diferentes alelos BoLA.

Amostra	BoLA-1 *02301	BoLA-3 *00201	BoLA-2 *01201	BoLA-6 *01301	BoLA-3 *00101	BoLA-6* 04101	BoLAT2C	BoLA – T5
<b>5T</b>	20	13	14	12	15	8	27	18
<b>7T</b>	20	13	14	12	15	8	27	18
<b>10T</b>	20	13	14	12	15	8	27	18
<b>12T</b>	20	13	14	12	15	8	27	18
<b>13T</b>	20	13	14	12	15	8	27	18
<b>16T</b>	20	13	14	12	15	8	27	18
<b>34</b>	23	12	19	9	14	6	20	23
<b>35</b>	23	12	19	9	14	6	20	23
<b>37</b>	23	12	19	9	14	6	20	23
<b>47</b>	23	12	20	9	14	6	20	23
<b>52</b>	22	13	19	9	15	7	21	22
<b>59</b>	21	13	19	9	15	7	21	23
<b>64</b>	21	13	19	9	15	7	21	23
<b>72.1</b>	20	10	17	10	13	5	22	20
<b>72.2</b>	20	10	17	10	13	5	22	20
<b>73</b>	20	10	17	10	13	5	22	20
<b>81</b>	23	12	19	11	14	6	21	22
<b>84</b>	18	11	17	9	14	5	23	20
<b>93</b>	22	12	18	11	15	5	21	21
<b>94</b>	22	12	18	11	15	5	21	21
<b>95</b>	22	12	18	11	15	5	21	21
<b>98</b>	22	12	18	11	15	5	21	21
<b>100</b>	22	11	18	11	14	5	22	21
<b>102</b>	22	11	18	11	14	5	22	21
<b>111</b>	21	11	18	10	14	4	21	21
<b>133</b>	21	11	18	10	14	4	21	21
<b>174</b>	21	10	18	8	13	4	19	21
<b>234</b>	22	12	18	9	14	6	18	22
<b>239</b>	22	12	18	9	14	6	18	22
<b>249</b>	22	12	18	9	14	6	18	22
<b>805</b>	21	11	18	9	15	4	21	20
<b>9653</b>	21	11	18	9	15	4	21	20
<b>ATCC49782</b>	23	12	19	11	14	6	21	22
<b>A203</b>	22	12	18	10	14	5	22	21
<b>BA78</b>	23	12	19	11	14	6	21	22
<b>GOTA</b>	22	12	17	10	15	5	22	22
<b>tp2*</b>	5	3	6	7	2	5	9	4

\* O mapeamento de epítomos de linfócitos TCD8 + também foi realizado para o antígeno tp2 de *Theileria parva*



### 5.3.3 Avaliação das características para expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Parâmetros como peso molecular (PM), índice de instabilidade, índice alifático, grande média de hidropatia (GRAVY), e a solubilidade foram preditos para os antígenos de *U. diversum* das amostras sequenciadas neste estudo.

**Tabela 08** - Propriedades físico-químicas determinadas por ProtParam, Protein-Sol e SOLpro.

Amostra	Protparam				GRAVY	Ptn-sol Predicted scaled solubility:	SOLpro
	N aa	PM	Inst index	Estab			
<b>5T</b>	304	35.6	37.55	Estável	-0.023	0.214	Insolúvel
<b>7T</b>	304	35.6	37.55	Estável	-0.023	0.214	Insolúvel
<b>10T</b>	304	35.6	37.55	Estável	-0.023	0.214	Insolúvel
<b>12T</b>	304	35.6	37.55	Estável	-0.023	0.214	Insolúvel
<b>13T</b>	304	35.6	37.55	Estável	-0.023	0.214	Insolúvel
<b>16T</b>	304	35.6	37.55	Estável	-0.023	0.214	Insolúvel
<b>34</b>	307	36.3	29.44	Estável	-0.292	0.247	Insolúvel
<b>35</b>	307	36.3	29.44	Estável	-0.292	0.247	Insolúvel
<b>37</b>	307	36.3	29.44	Estável	-0.292	0.247	Insolúvel
<b>47</b>	307	36.3	29.17	Estável	-0.291	0.241	Insolúvel
<b>52</b>	307	36.3	28.95	Estável	-0.288	0.245	Insolúvel
<b>59</b>	307	36.3	29.08	Estável	-0.286	0.242	Insolúvel
<b>64</b>	307	36.3	29.08	Estável	-0.286	0.242	Insolúvel
<b>72.1</b>	309	36.4	29.68	Estável	-0.198	0.250	Insolúvel
<b>72.2</b>	309	36.4	29.68	Estável	-0.198	0.250	Insolúvel
<b>73</b>	309	36.4	29.68	Estável	-0.198	0.250	Insolúvel
<b>81</b>	307	36.2	29.12	Estável	-0.258	0.246	Insolúvel
<b>84</b>	309	36.4	28.91	Estável	-0.188	0.229	Insolúvel
<b>93</b>	307	36.1	29.40	Estável	-0.248	0.221	Insolúvel
<b>94</b>	307	36.1	29.40	Estável	-0.248	0.221	Insolúvel
<b>95</b>	307	36.1	29.40	Estável	-0.248	0.221	Insolúvel
<b>98</b>	307	36.1	29.40	Estável	-0.248	0.221	Insolúvel
<b>100</b>	307	36.1	29.70	Estável	-0.262	0.219	Insolúvel
<b>102</b>	307	36.1	29.70	Estável	-0.262	0.219	Insolúvel
<b>111</b>	307	36.1	27.44	Estável	-0.264	0.222	Insolúvel
<b>133</b>	307	36.1	27.44	Estável	-0.264	0.222	Insolúvel
<b>174</b>	307	36.0	27.44	Estável	-0.264	0.244	Insolúvel
<b>234</b>	307	36.3	31.76	Estável	-0.249	0.220	Insolúvel
<b>239</b>	307	36.3	31.76	Estável	-0.249	0.220	Insolúvel
<b>249</b>	307	36.3	31.76	Estável	-0.249	0.220	Insolúvel
<b>805</b>	306	35.6	28.08	Estável	-0.260	0.217	Insolúvel
<b>9653</b>	306	35.6	28.08	Estável	-0.260	0.217	Insolúvel
<b>ATCC49782</b>	307	36.2	29.12	Estável	-0.258	0.246	Insolúvel
<b>A203</b>	307	36.1	30.02	Estável	-0.251	0.217	Insolúvel
<b>BA78</b>	307	36.2	29.12	Estável	-0.258	0.246	Insolúvel
<b>GOTA</b>	307	36.1	29.17	Estável	-0.251	0.205	Insolúvel

O peso molecular das amostras sequenciadas neste estudo variou entre 35,6 e 36,4 kDa (quilodalton). As sequencias com o maior peso molecular foram 72.1, 72.2, 73

e 84 (36,4 kDa), enquanto com peso molecular mais baixo foram as 6 amostras de sêmen e as amostras 805 e 9653 35,6 kDa (Tabela 08). As taxas de instabilidade variaram de 27,44 (111, 133 e 174) a 37,55 (5T, 7T, 10T, 12T, 13T, 16T). Em geral, quando este índice é inferior a 40, as proteínas são consideradas estáveis, concordando com a predição de estabilidade. O parâmetro GRAVY foi estudado para avaliar hidrofobicidade, mas nenhuma das sequencias exibiram resultado positivo. Quanto à solubilidade, todas as sequencias foram classificadas como insolúveis, tanto no programa Protein-Sol quanto em SOLpro.

#### *5.3.4 Avaliação da presença de sinal para excreção pelas vias clássicas e não clássicas*

A análise da secreção clássica mediada por peptídeo sinal foi realizada por SignalP5. Este servidor previu baixa probabilidade de peptídeo sinal em todas as 36 sequencias estudadas, para nenhum dos 3 sítios de clivagem avaliados (sec/SPI, Tat/SPI, sec/SPII) (Tabela 09). De acordo com o preditor TMHMM, nenhuma sequencia possuía loops transmembranares, em que todas as sequencias encontram-se na região exterior, sendo 23 delas classificadas como citoplasmáticas pelo PSortB.

**Tabela 09** - Predição de peptídeo sinal, presença de alça transmembrânica e localização subcelular.

Amostra	Signal P				SecretomeP score	TMHMM	PSortB	DOLOP
	Signal peptide (Sec/SPI)	TAT signal peptide (Tat/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	Other				
5T	0.0201	0.0011	0.002	0.9767	0.349547	0/outside	Unknown	-
7T	0.0201	0.0011	0.002	0.9767	0.349547	0/outside	Unknown	-
10T	0.0201	0.0011	0.002	0.9767	0.349547	0/outside	Unknown	-
12T	0.0201	0.0011	0.002	0.9767	0.349547	0/outside	Unknown	-
13T	0.0201	0.0011	0.002	0.9767	0.349547	0/outside	Unknown	-
16T	0.0201	0.0011	0.002	0.9767	0.349547	0/outside	Unknown	-
34	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.168799	0/outside	Cytoplasmic	-
35	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.168799	0/outside	Cytoplasmic	-
37	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.168799	0/outside	Cytoplasmic	-
47	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.146693	0/outside	Cytoplasmic	-
52	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.157614	0/outside	Unknown	-
59	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.136166	0/outside	Cytoplasmic	-
64	0.0175	0.0008	0.0022	0.9796	0.136166	0/outside	Cytoplasmic	-
72.1	0.0124	0.0004	0.0018	0.9653	0.196983	0/outside	Unknown	-
72.2	0.0124	0.0004	0.0018	0.9653	0.196983	0/outside	Unknown	-
73	0.0124	0.0004	0.0018	0.9653	0.196983	0/outside	Unknown	-
81	0.0156	0.0006	0.0018	0.962	0.165324	0/outside	Cytoplasmic	-
84	0.0124	0.0004	0.0018	0.9653	0.178205	0/outside	Unknown	-
93	0.0203	0.0009	0.0022	0.9767	0.163592	0/outside	Cytoplasmic	-
94	0.0203	0.0009	0.0022	0.9767	0.163592	0/outside	Cytoplasmic	-
95	0.0203	0.0009	0.0022	0.9767	0.163592	0/outside	Cytoplasmic	-
98	0.0203	0.0009	0.0022	0.9767	0.163592	0/outside	Cytoplasmic	-
100	0.0218	0.0009	0.0023	0.975	0.175743	0/outside	Cytoplasmic	-
102	0.0218	0.0009	0.0023	0.975	0.175743	0/outside	Cytoplasmic	-
111	0.0218	0.0009	0.0023	0.975	0.177116	0/outside	Cytoplasmic	-
133	0.0218	0.0009	0.0023	0.975	0.177116	0/outside	Cytoplasmic	-
174	0.0475	0.0017	0.0381	0.9127	0.186069	0/outside	Cytoplasmic	-
234	0.0143	0.0007	0.002	0.963	0.246798	0/outside	Cytoplasmic	-
239	0.0143	0.0007	0.002	0.963	0.246798	0/outside	Cytoplasmic	-
249	0.0143	0.0007	0.002	0.963	0.246798	0/outside	Cytoplasmic	-
805	0.0237	0.0013	0.0026	0.9724	0.203260	0/outside	Unknown	-
9653	0.0237	0.0013	0.0026	0.9724	0.203260	0/outside	Unknown	-
ATCC 49782	0.0156	0.0006	0.0018	0.962	0.165324	0/outside	Cytoplasmic	-
A203	0.0223	0.0009	0.0026	0.9742	0.175636	0/outside	Cytoplasmic	-
BA78	0.0156	0.0006	0.0018	0.962	0.165324	0/outside	Cytoplasmic	-
GOTA	0.0192	0.0009	0.002	0.9779	0.153708	0/outside	Cytoplasmic	-

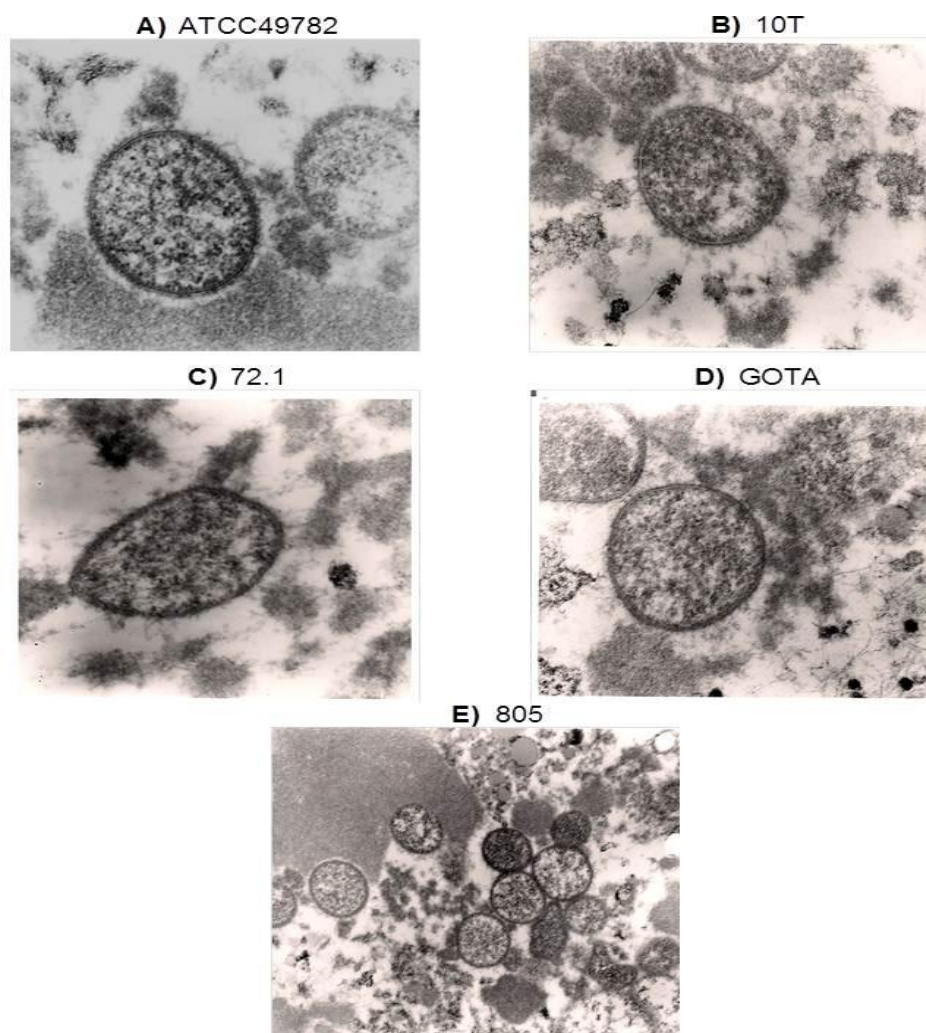
O servidor DOLOP, que usa uma série de critérios para prever peptídeos sinal, não exibiu resultados positivos. Nenhuma das 36 sequencias avaliadas também no preditor SecretomeP (excreção não mediada por peptídeo sinal), exibiram valores (score) significantes (maior que 0,5).

## 5.4 Detecção, quantificação e caracterização de carboidratos do polissacarídeo capsular

### 5.4.1 Presença de cápsula

As células de *U. diversum*, a partir de cultivo, apresentaram uma camada densa externa à da membrana celular dos microrganismos estudados. Esta estrutura apresentou-se difusa e amorfa, estendendo 11 a 17 nm a partir da membrana em todas as cepas e isolados analisados (Figura 08). Este material polissacarídico foi observado em menor intensidade, internamente a membrana celular, o que pode indicar uma secreção deste material momento do cultivo.

**Figura 08** - Microscopia eletrônica de células de *U. diversum*,



**Legenda** - Microscopia eletrônica de células de *U. diversum*, obtidas no cultivo de isolados provenientes de amostras mucovulvovaginais e sêmen bovino, tratadas com vermelho de ruteno, evidenciando material polissacarídico.

#### 5.4.2 Quantificação de carboidratos totais no polissacarídeo capsular

A extração e quantificação do polissacarídeo capsular foram realizadas através da metodologia de fenol-ácido sulfúrico, obtendo assim o valor médio de 67,62 µg/mL de carboidratos totais. Na tabela 10 é possível verificar que a dosagem de carboidratos das amostras analisadas varia entre 49,80µg/ mL e 87,70µg/ mL.

**Tabela 10** - Quantificação de carboidratos presentes no polissacarídeo capsular de amostras de *Ureaplasma diversum*

<b>Amostra</b>	<b>Concentração Carboidratos (µg/mL)</b>
<b>ATCC 49782</b>	65,77
<b>10T</b>	71,84
<b>72.1</b>	72,37
<b>234</b>	49,80
<b>GOTA</b>	62,36
<b>174</b>	87,70
<b>805</b>	63,53

A composição química do material capsular de *U. diversum* ATCC 49782 e de outras seis cepas foi posteriormente avaliada. Arabinose, xilose, manose, galactose e glicose foram os principais componentes detectados no material capsular dessa bactéria (Tabela 10). A amostra 174 contém a maior variedade de açúcares, não possuindo apenas a xilose em sua composição. A glicose foi o açúcar em maior quantidade na composição da maioria das amostras, com exceção apenas na amostra 72.1, constituída majoritariamente por galactose. A ramnose foi encontrada nas amostras 174 e 234, enquanto a fucose apenas em 174. Os açúcares manose, galactose e glicose foram identificados em todas as amostras.

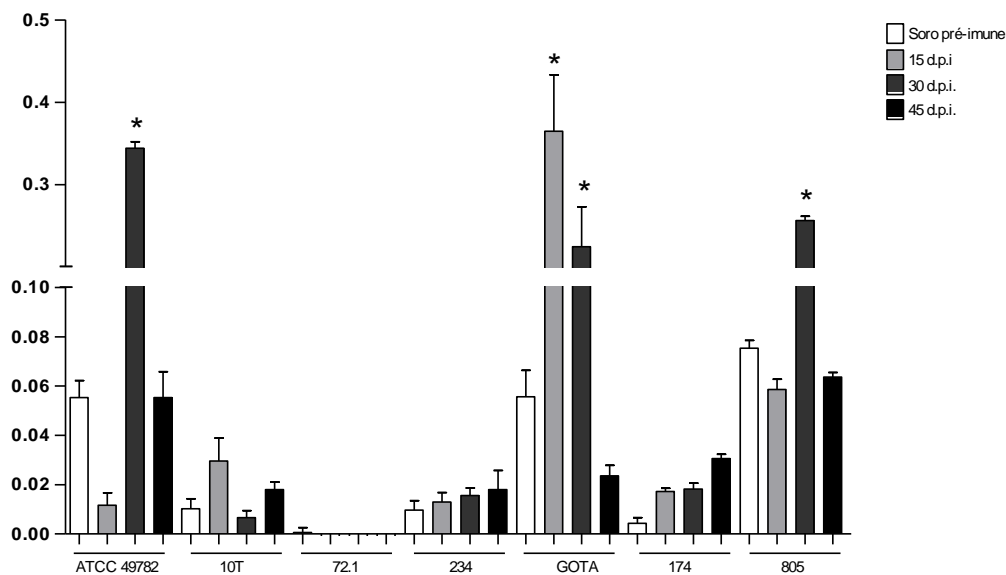
**Tabela 11** - Caracterização dos carboidratos presentes no polissacarídeo capsular de amostras de *Ureaplasma diversum*

Monossacarídeos	10T	72.1	234	GOTA	174	805	ATCC 49782
Ramnose (%)	0,0	0,0	3,3	0,0	5,4	0,0	0,0
Fucose (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4	0,0	0,0
Arabinose (%)	0,0	12,6	1,0	5,6	5,8	5,2	6,5
Xilose (%)	0,0	0,0	0,0	5,4	0,0	7,0	5,4
Manose (%)	21,2	22,6	25,0	30,2	21,2	6,2	24,0
Galactose (%)	19,9	33,5	12,5	20,3	20,4	30,2	17,3
Glicose (%)	58,9	31,3	58,1	38,6	38,3	51,4	50,8

### 5.5 Antigenicidade e Imunogenicidade do polissacarídeo capsular de *U. diversum*

A imunogenicidade dos polissacarídeos capsulares foi avaliada por ELISA indireto pela produção de IgG. Os anticorpos foram produzidos em camundongos e a cinética de produção de anticorpos após 15, 30 e 45 dias foi avaliada pela produção de IgG após a inoculação de novas doses/reforços (Figura 9). Após 15 dias da inoculação, a amostra GOTA induziu maior resposta de anticorpos, em relação ao soro pré-imune, o que se manteve após 30 dias de inoculação. A produção dos anticorpos estabilizou-se no maior título após 30 dias de inoculação das amostras ATCC 49782 e 805. No entanto até 45 dias, após inoculação, não foi possível observar algum estímulo persistente para a indução de níveis significantes de anticorpos contra o polissacarídeo capsular dos ureaplasma estudados. Este resultado indica pouca imunogenicidade. No entanto, o polissacarídeo capsular, pode ser bastante antigênico, uma vez que a esta estrutura é um dos maiores fatores de virulência de *U. diversum*.

**Figura 09** - Análise da reatividade de anticorpos policlonais ao polissacarídeo capsular de *Ureaplasma diversum*.



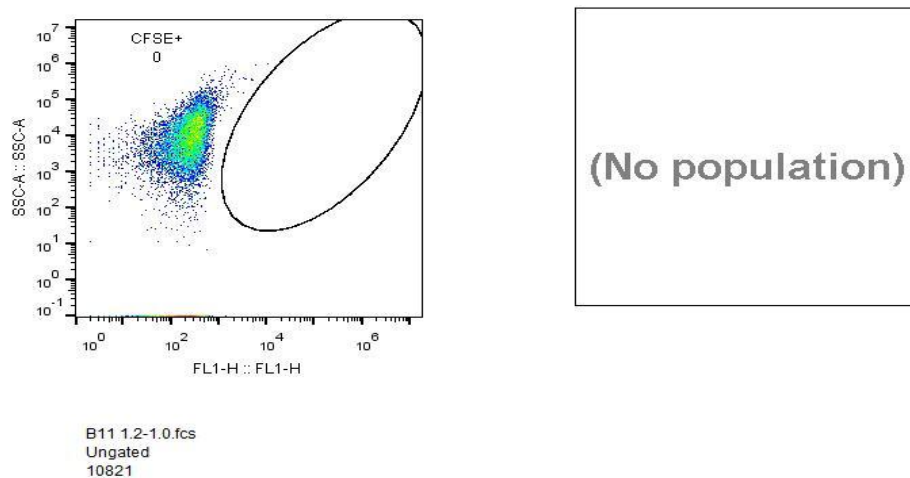
**Legenda** - Absorbância a 450 nm dos níveis de anticorpos anti-polissacarídeos determinados por ELISA indireto. Os soros foram dos camundongos imunizados por via subcutânea com polissacarídeo capsular após 0, 15, 30 e 45 dias de inoculação.

## 5.6 Ensaios de antigenicidade e virulência dos polissacarídeos capsulares

### 5.6.1 Proliferação linfocitária

Diferentes concentrações dos polissacarídeos capsulares foram incubadas com células de sangue periférico de bovinos e analisadas por citometria de fluxo. Verificou-se que não houve reconhecimento do polissacarídeo na superfície de linfócitos, indicando que o reconhecimento provavelmente seja linfócito-independente (Figura 10). O reconhecimento seria observado pelo aumento da intensidade média de fluorescência (MFI) nos linfócitos. A ausência de nova geração de população celular (aumento da fluorescência) após o estímulo da presença dos polissacarídeos capsulares, indicaria que ausência de reconhecimento na superfície dessas células.

**Figura 10** – Ensaio de proliferação linfocitária (CFSE) pela marcação de linfócitos com FITC, após exposição de polissacarídeos de *U. diversum*.



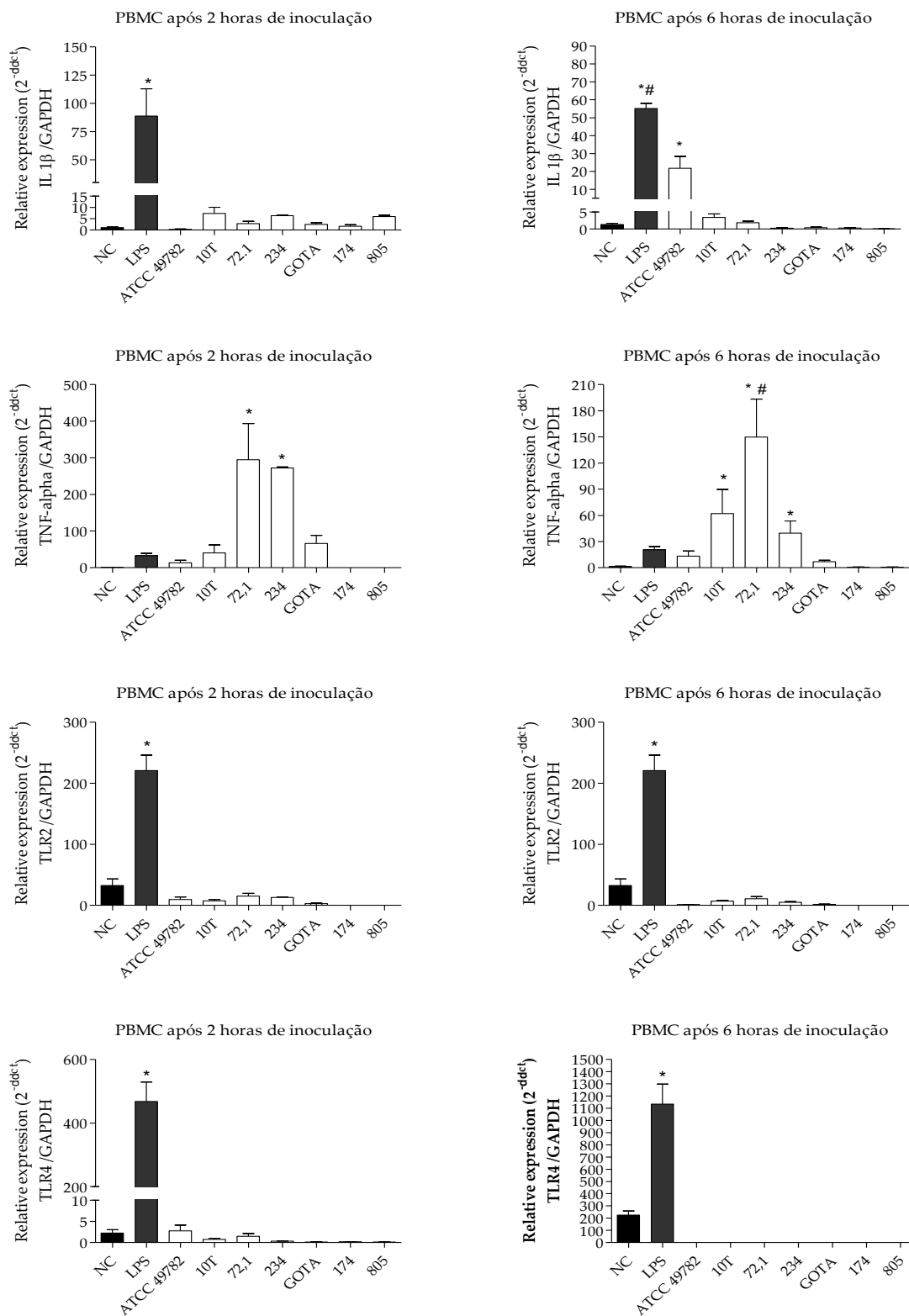
**Legenda** – Detecção da divisão de linfócitos por intensidade de fluorescência. A região delimitada (área do pico) representa a avaliação do espectro de emissão de CFSE (5 (6)-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster).

### 5.6.2 Expressão gênica

De acordo com os resultados apresentados na figura 11, houve maior produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  nos macrófagos na presença dos polissacarídeos das amostras 72.1 e 234, após 2 e 6 horas de exposição, em relação aos controles. A amostra 10T induziu o aumento significativo da mesma citocina após 6 horas de exposição. Apenas a cepa ATCC 49782 induziu significativamente a expressão de IL-1 $\beta$  após 6 horas de inoculação. A expressão dos TLR 2 e 4 não foi significativa. Essa resposta indica a ocorrência de processo inflamatório discreto.

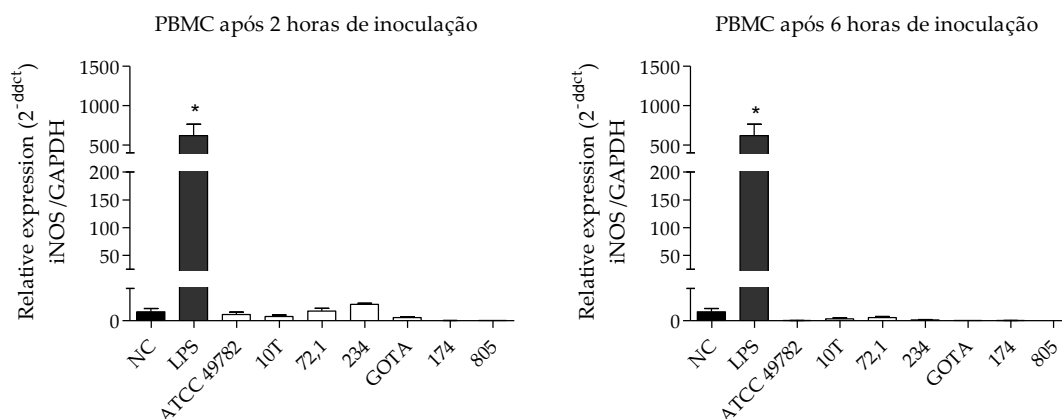


**Figura 11** - Expressão gênica de citocinas e TLR's em PBMC bovinos experimentalmente expostos por 2 e 6 horas com polissacarídeos capsulares de diferentes cepas de *Ureaplasma diversum*.



**Legenda** - Expressão gênica de marcadores inflamatórios e TLRs em PBMC bovinos expostos a 0,5, 1,0 e 2,0 µg / mL de polissacarídeos capsulares de *U. diversum*. O controle negativo (NC) e o controle positivo foi PBS e LPS (100 ng / mL), respectivamente.

**Figura 12** - Expressão gênica de iNOS em PBMC bovinos experimentalmente expostos por 2 e 6 horas com polissacarídeos capsulares das amostras de *Ureaplasma diversum*.

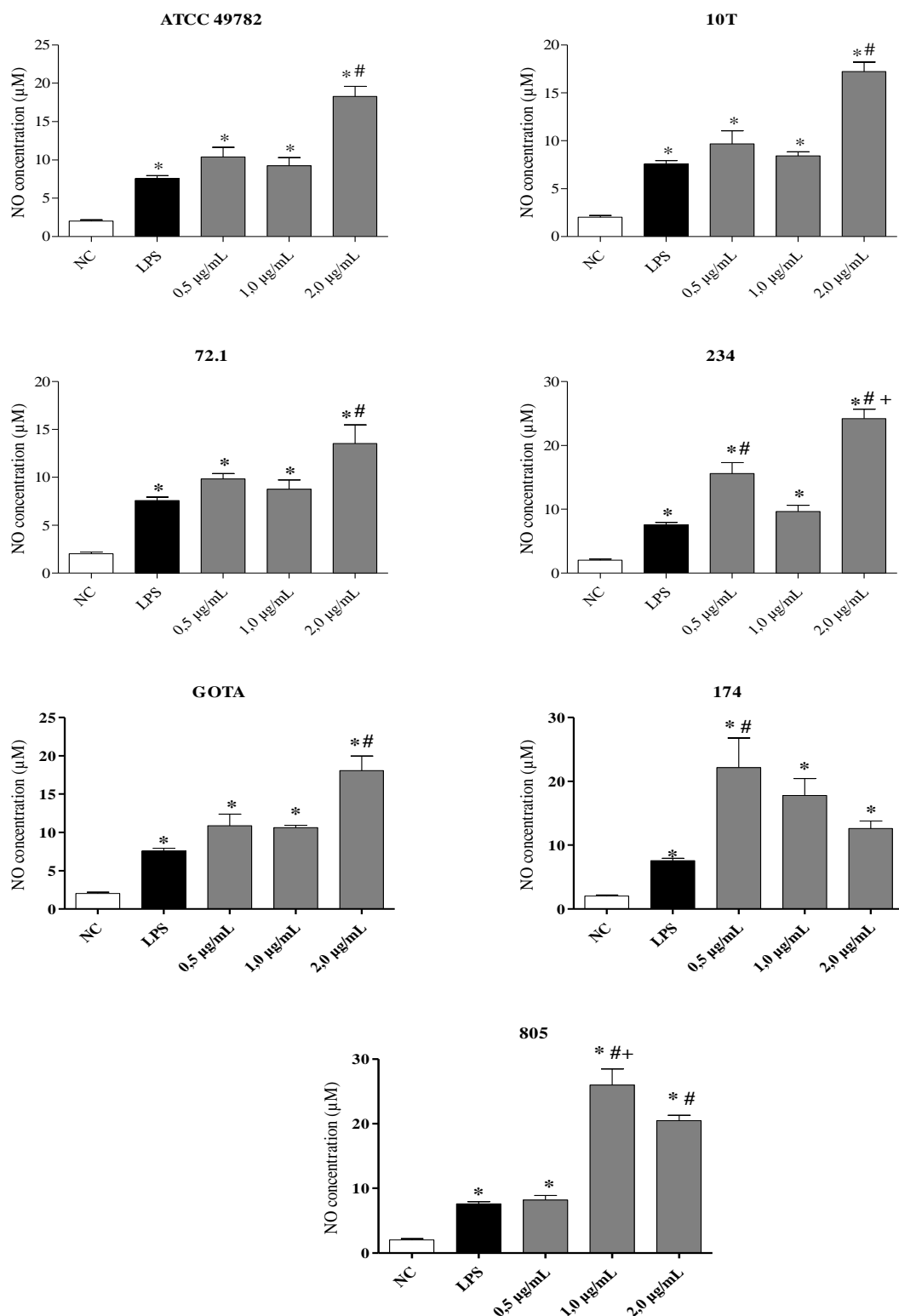


**Legenda** - Expressão gênica de iNOS em PBMC bovinos expostos a 0,5, 1,0 e 2,0  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de polissacarídeos capsulares de *U. diversum*. O controle negativo (NC) e o controle positivo foi PBS e LPS (100 ng / mL), respectivamente.

### 5.6.3 Dosagem de nitrito em sobrenadante da cultura de macrófagos bovinos

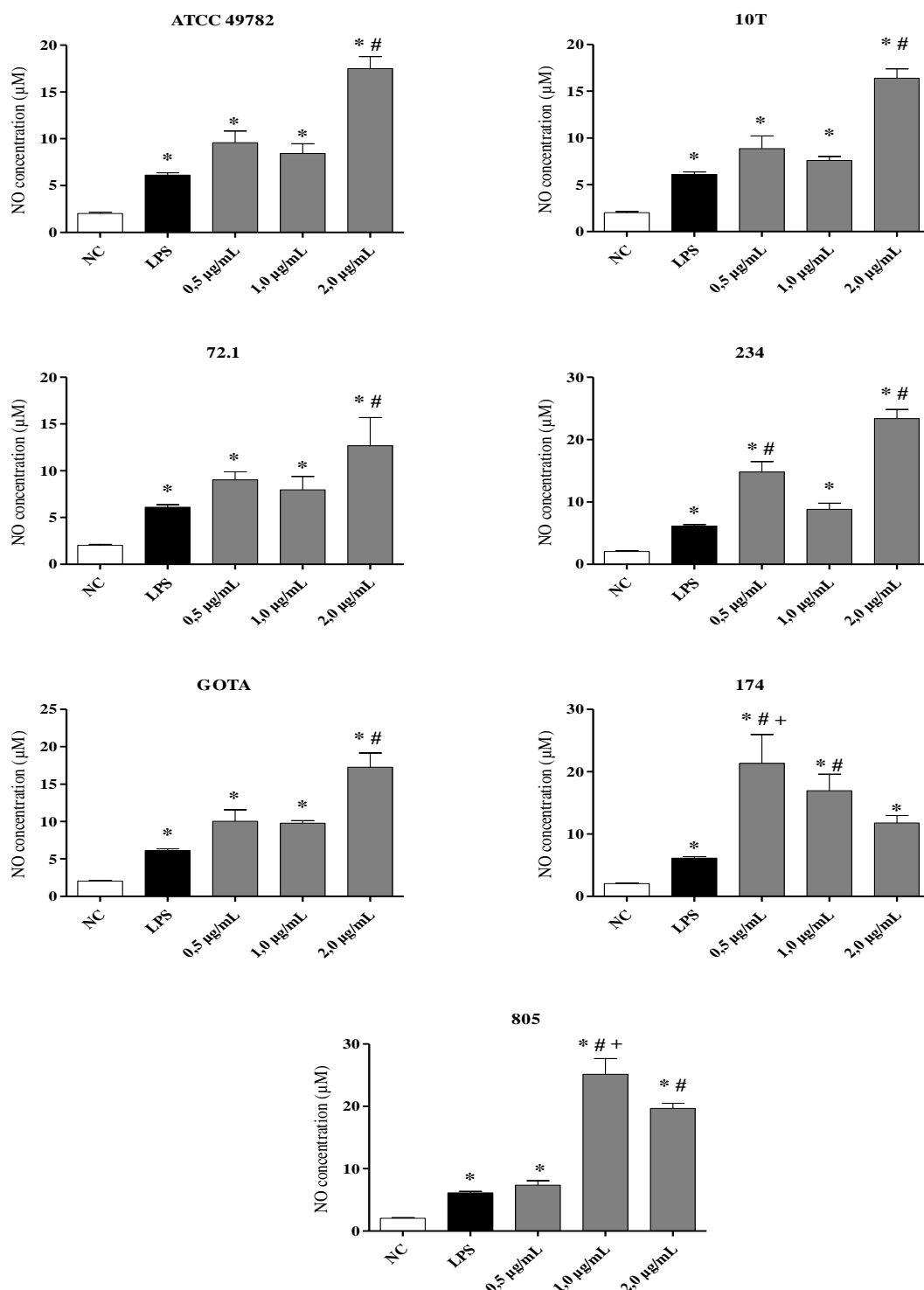
Para examinar a relação entre o estímulo da produção de nitrito pelos macrófagos de bovinos e a exposição aos polissacarídeos capsulares, as células foram expostas por dois períodos diferentes (2 e 6 horas). Diferente da expressão gênica de iNOS (Figura 12), em ambos os tempos avaliados, observou-se que na concentração de 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  todos os polissacarídeos induziram uma maior quantidade de nitrito em relação ao controle negativo (Figuras 13 e 14). Diferentemente, a amostra 174 provocou a maior resposta na concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em ambos os períodos avaliados. Diferente do esperado, as respostas não foram dose-dependentes.

**Figura 13** - Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos após 2 horas de exposição a variadas concentrações do polissacarídeo capsular de diferentes cepas de *Ureaplasma diversum*.



**Legenda** – Dosagem de nitrito pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos após 2 horas de exposição às concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 µg / mL de polissacarídeos capsulares de *U. diversum*. O controle negativo (NC) e o controle positivo foi PBS e LPS (100 ng / mL), respectivamente.

**Figura 14** - Dosagem de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos após 6 horas de exposição a variadas concentrações do polissacarídeo capsular de diferentes cepas de *Ureaplasma diversum*.



**Legenda** – Dosagem de nitrito pelo método de Griess em sobrenadante de cultura de macrófagos bovinos após 6 horas de exposição às concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 µg / mL de polissacarídeos capsulares de *U. diversum*. O controle negativo (NC) e o controle positivo foi PBS e LPS (100 ng / mL), respectivamente.

## 6 DISCUSSÃO

Existem poucos dados na literatura sobre a resposta imune dos hospedeiros animais às infecções por *U. diversum*. Também poucos estudos existem quanto ao papel das moléculas de superfície e seu potencial antigênico nestas bactérias. Embora estudos clínicos tenham relatado a associação entre afecções perinatais e infecção por ureaplasmas, principalmente em humanos, os fatores de virulência de *Ureaplasma spp.* associados a problemas na gestação ainda não são claros. Por ser o primeiro genoma completo sequenciado no grupo de *U. diversum*, este serviu como um bom complemento para o estudo da evolução dos *Mollicutes* (MARQUES et al., 2016). Os estudos de sequenciamento de genes específicos ou do genoma completo revelam processos importantes, como a ocorrência de grandes rearranjos genéticos. Durante sua co-evolução com os seres humanos, os ureaplasmas aparentemente alcançaram uma coexistência bem-sucedida, com altos níveis populacionais levando-se em consideração seus limitados recursos genômicos. Para tanto, precisaram reduzir algumas características da sua virulência, como a perda de grande parte da cápsula (sintetizada pela enzima glicosiltransferase) e o mimetismo de outras moléculas de superfície – tornando-se menos agressivos – e passando a utilizar um resíduo produzido pelo hospedeiro (uréia) como fonte de energia. Esta relação parasitária ou simbiótica contribui para a controvérsia associada ao estudo da infecção por ureaplasmas humanos (RAZIN et al., 1998; KONG e GILBERT, 2004).

No presente estudo, o gene UD216 não foi amplificado em todos os isolados avaliados. Provavelmente havia alterações no local de inserção dos *primers* que impediram a amplificação destes genes em alguns isolados. Outra possibilidade, pela associação dos resultados do alinhamento gênico deste estudo, é de que os resultados negativos podem relacionar-se ao fato de que as sequências codificantes destes genes podem variar de acordo com as condições ambientais ou devido à pressão seletiva da resposta imune do hospedeiro. Lairson e colaboradores (2008) descrevem que algumas espécies de micoplasmas, que são organismos que sofreram perda maciça de genes durante a evolução degenerativa e se tornaram simbiontes ou parasitas obrigatórios. Estes parecem ter nenhum ou poucos genes de glicosiltransferase detectáveis. Contudo, após análises *in silico* de genes de *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides* (Mmm) potencialmente envolvidos na biossíntese de polissacarídeos, Bertin e colaboradores (2013) propuseram vias candidatas que poderiam explicar a produção alternativa do polissacarídeo capsular. Outros dados genômicos comparativos mostraram que vários

genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos têm sido horizontalmente transferidos entre membros do cluster *M. mycoides* e outras espécies de micoplasma, como *M. agalactiae* (BERTIN et al., 2015; SIRAND-PUGNET et al., 2007). Análises *in silico* em *M. agalactiae* para reconstruir as vias biossintéticas correspondentes à secreção do polissacarídeo capsular demonstraram que esta é regulada pela alta frequência de variação de fase (GAURIVAUD et al., 2016).

O genoma de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*SC (*Mmymy*SC) contém dois grupos de genes envolvidos na síntese da cápsula. A redundância desses genes pode permitir que este microrganismo produza quantidade relativamente elevada de cápsula e, desse modo, aumente a virulência do organismo e reduza o risco de fagocitose pelas células hospedeiras. Também pode ser uma maneira de variar a composição da cápsula, a fim de escapar da resposta imune do hospedeiro (WESTBERG et al., 2004). Em *M. pneumoniae* foram identificadas três glicosiltransferases (GTs), potencialmente envolvidas na produção dos glicolipídios, mas as funções destas são pouco conhecidas (KLEMENT et al., 2007). Em *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, o sequenciamento evidenciou a presença de apenas um cluster envolvido na síntese da cápsula e contendo genes para glicosiltransferase (CHEN et al., 2017). Devido ao papel fundamental dos glicoglicerolipídios na estabilidade da membrana em micoplasmas e ao fato de que essas estruturas lipídicas estão ausentes nos hospedeiros animais de infecções por micoplasma, supõe-se que as glicosiltransferases envolvidas em sua biossíntese sejam alvos potenciais para a descoberta de drogas (ANDRES et al., 2011).

O sequenciamento do gene codificador de glicosiltransferase nos isolados de *U. diversum* evidenciou similaridade mas com a detecção de alguns polimorfismos. O alinhamento das sequências dos isolados evidenciou outros rearranjos gênicos, regiões que foram deletadas, e algumas regiões que foram inseridas e são novas para *U. diversum*, quando comparadas com a cepa ATCC 49782 (MARQUES et al., 2016). A análise da distribuição intra-específica do gene da glicosiltransferase pelo sequenciamento de diferentes isolados apresentam informações adicionais para compreender melhor a sua relação. A proximidade filogenética entre os isolados permitiu a formação de grupos com alta confiabilidade (maior que 98%) enquanto algumas amostras demonstraram baixa proximidade gênica e não se agruparam, ou a proximidade genética entre elas não era tão alta (menor que 98%). Esses resultados são

semelhantes aos identificados por Marques (2009) a partir do sequenciamento parcial do gene 16S de *U. diversum*.

Em micoplasmas, poucos estudos são feitos comparando as sequências de glicosiltransferase das cepas de referência em relação a isolados clínicos, além de que em ureaplasmas a enzima glicosiltransferase ainda não é bem caracterizada molecularmente e antigenicamente. As glicosiltransferases são as enzimas responsáveis pela iniciação e alongamento das cadeias de glicano, à medida que transferem os resíduos de açúcar ativados para o receptor apropriado (LAIRSON et al., 2008). Estas enzimas podem estar associadas com a biossíntese da membrana lipídica ou da cápsula polissacarídica ou de lipoglicano em micoplasmas.

Os ureaplasmas humanos possuem cápsula ou exopolissacarídeo, que contém resíduos glicosilados (KONG e GILBERT, 2004). Nos ureaplasmas humanos, o gene *epsG* codifica a glicosiltransferase, que está envolvida na biossíntese do exopolissacarídeo. Não existe um *cluster* de genes específico para esta função no genoma de ureaplasmas humanos (KONG e GILBERT, 2004). Desta maneira, novamente reforça-se o conceito de “evolução degenerada ou reversa” também nos ureaplasmas humanos das bactérias gram-positivas (RAZIN et al., 1998). Em *Mycoplasma spp.*, após análises por sequenciamento, foi observada a presença de glicosiltransferases da família GT2 em mais de 18 espécies diferentes (KLEMENT et al., 2007). Demonstrou-se que as enzimas GT2 são as glicosiltransferases mais comuns em micoplasmas patogênicos e são codificadas por genes essenciais, como demonstrado pela inativação deste gene em *Mycoplasma genitalium* (ANDRES et al., 2011).

Estudos comparativos com ureaplasmas humanos entre os genomas completos de *U. urealyticum* e *U. parvum*, avaliaram os padrões de evolução e adaptação. A comparação gênica permite analisar se existe ou não fluxo gênico entre as diferentes cepas ou qual o status de conservação desses genes dentro da espécie (KONG e GILBERT, 2004, PARALANOV et al., 2012; PARALANOV, 2014). Em outro estudo, realizado por Kong e Gilbert (2004) verificou-se a heterogeneidade genômica intraespécie, e que esta é muito menor do que entre espécies. As unidades repetitivas dos principais antígenos de superfície de ureaplasmas humanos têm múltiplos formatos, localizando-se na superfície e reconhecidas pelo hospedeiro. A mudança de padrão de repetição permite que evitem a resposta imune (KONG e GILBERT, 2004, ROBINSON et al., 2013; ABOKLAISH et al., 2016).

A troca de fase de genes que expressam antígenos proteicos de superfície de membrana é comum no gênero *Mycoplasma* (YOGEV et al., 2002; CITTI et al., 2010). Esta estratégia microbiana é importante para adaptação ao hospedeiro e evasão de respostas imunes, garantindo a manutenção da diversidade em uma população em colonização. Em ureaplasma, estudos com *Ureaplasma urealyticum* e *U. parvum*, espécies colonizadoras em humanos, caracterizaram alguns fatores envolvidos. Estes possuem pelo menos dois conjuntos de genes que usam a inversão cromossômica para alterar sua expressão de antígenos de superfície. As infecções por ureaplasma em humanos, em geral, são assintomáticas. Desta maneira, é necessário elucidar o papel que a variação antigênica desempenha na resposta imune do hospedeiro e como correlaciona-se com a sua patogenicidade (ZIMMERMAN et al., 2011).

As proteínas de superfície ou secretadas ou lipoproteínas precisam ser melhor estudadas e caracterizadas uma vez que são candidatas para o desenvolvimento de vacinas ou desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico. Tal importância se dá, pois, seus antígenos microbianos são mais facilmente acessíveis para os anticorpos e componentes do sistema imune. As glicosiltransferases constituem um dos maiores fatores de virulência para *S. mutans*. Atuam produzindo biofilmes mediando a ligação da sacarose à superfície dos dentes durante a formação da cárie. Devido a sua localização na superfície celular, são um alvo interessante para o desenvolvimento de vacinas eficientes, uma vez que o seu bloqueio pode reduzir a virulência do microrganismo. É uma estratégia interessante para inibir a virulência de bactérias cariogênicas, pois não precisam ser eliminadas da comunidade microbiana bucal, representando uma abordagem de grande potencial para prevenir a cárie dentária (GUO et al., 2004; HOSHINO et al., 2011; REN et al., 2016).

Durante uma infecção, o reconhecimento de segmentos específicos dos antígenos do agente infeccioso (epítomos), promove a ligação às células de defesa e efetivam a resposta imune protetora. Os epítomos são regiões que se ligam a receptores de membrana em linfócitos específicos ao antígeno ou anticorpos secretados (CHAUDHURI et al., 2014) e constituem a unidade imune mínima suficiente para provocar a resposta imune humoral (SUN et al., 2013). Estes epítomos podem ser lineares ou conformacionais, sendo os últimos em maior quantidade (JESPERSEN et al., 2017). Apesar de não serem previstas como antigênicas pelo preditor VaxiJen, as demais predições indicaram que todas as sequências do gene UD216 avaliadas possuem epítomos conformacionais e lineares para linfócitos B. Esta caracterização indica que



essas moléculas podem estimular o desenvolvimento da resposta imune humoral, considerando que *Ureaplasma diversum* pode colonizar o ambiente intracelular (BUZINHANI et al., 2011; HOBSON et al., 2013; AMORIM et al., 2014). Os antígenos podem ser processados e apresentados via MHCI, ativando uma resposta imune celular. Além da predição de propriedades imunobiológicas, a observação de propriedades favoráveis à expressão em sistema heterólogo, pode contribuir para produção em larga escala de um possível alvo biológico. Neste estudo, o peso molecular médio das sequências avaliadas foi de 36,0 kDa, valor bem tolerado na expressão em *E. coli* (SORENSEN et al., 2005; ADRIO e DEMAIN, 2010; CHANG et al., 2014). Os resultados obtidos também mostraram que as sequências possuem índice de instabilidade abaixo de 40, sendo consideradas estáveis (GASTEIGER et al., 2005). Todas as sequências eram GRAVY negativas, o que as caracteriza como hidrofílicas, possibilitando o aumento da sua solubilidade (VANDAHL et al., 2005). Apesar disso, as predições em Solpro e proteinSol indicaram as sequências como insolúveis, corroborando com os resultados de TMHMM sobre a ausência de alças transmembrana, regiões que reduzem a solubilidade (KALL et al., 2004), aumentando as etapas de purificação proteica (SINGH e PANDA, 2005).

No presente estudo, a ligação de epítomos para alelos bovinos de MHCI foram previstas em todas as sequências, com conexões maiores que o antígeno Tp2 de *Theileria parva* em todos os alelos estudados, com exceção do alelo BoLA-6\*04101. O antígeno Tp2 é reconhecido por estimular CD8 + Células T durante a infecção bovina por *T. parva* (PELLE et al., 2011). Os alelos estudados representam espécies de gado destinadas a diferentes setores da pecuária - produção de carne e leite (SARTORI et al., 2016). Cinco alelos que representam touros *Bos taurus* (BoLA-6 \* 01301, BoLA-2 \* 01201, BoLA-3 \* 00201, BoLA-1 \* 02301 e BoLA-6 \* 04101), dois alelos representando gado *Bos taurus indicus* (BoLA - T5, BoLA-3 \* 00101) e um alelo (BoLA-T2C) pertence a um híbrido (HANSEN et al., 2014). Nossos resultados revelam que a interação com alelos MHCI de espécies de bovinos destinados a diferentes atividades na pecuária podem refletir na ativação da resposta imune nesses animais (VLASOVA e SAIF, 2021). A identificação de epítomos de células B é importante para aplicações em imunodeteção e imunoterapia, com o desenvolvimento de novas terapias, vacinas e testes de diagnóstico. A presença de marcadores específicos capazes de direcionar peptídeos heterólogos para o meio extracelular em um sistema de expressão também contribui para as etapas subsequentes na produção de proteínas

recombinantes (CHAUDHRY et al., 2005; ADRIO e DEMAIN, 2010; ROSANO e CECCARELLI, 2014). Aqui, mostramos baixa probabilidade de peptídeo sinal em todas as 36 sequencias estudadas, para os sítios de clivagem sec/SPI, Tat/SPI, sec/SPII, não sendo exportadas para o meio extracelular por *E. coli*. A presença de peptídeo sinal para uma via secretora clássica ou marcadores de secreção por via não clássica facilitaria o transporte e secreção para o compartimento extracelular. Isso simplificaria os processos de purificação, protegendo as proteínas heterólogas da proteólise, diminuindo os níveis de endotoxina e melhorando a atividade biológica e solubilidade (MOHAMMADI et al., 2019).

Proteínas bacterianas com propriedades favoráveis para estimular a resposta imune, clonagem e expressão em um sistema heterólogo são alvos desejáveis para a biotecnologia (CHAUDHRY et al., 2005). Neste estudo, as análises de bioinformática mostraram que as sequencias de glicosiltransferase avaliadas possuem algumas características que dificultam a expressão em *E. coli* como um sistema heterólogo para aplicações imunobiológicas. Tal fato não as descarta como alvos para estudos de finalidades biotecnológicas ou expressão em um sistema heterólogo diferente de *E. coli* (KAUR et al., 2018). Além disso, há a possibilidade de utilizar estratégias como a fusão com proteínas (tag) que melhoram solubilidade, reduzir a temperatura de crescimento, uso de promotores e uso de baixas concentrações de indutor (SORENSEN et al., 2005). Portanto, a inclusão de etapas de planejamento e predição prévias a expressão de proteínas pode reduzir os custos, além de fornecer uma previsão teórica para testes laboratoriais.

Ao observar a constituição de açúcares do polissacarídeo extraído das diferentes cepas de *U. diversum*, nota-se variabilidade entre elas. Testamos apenas um representante de cada grupo formado pela filogenia, dificultando a observação da influencia de pequenas variações genéticas na composição de açúcares. Contudo, não houve influencia da localização de origem das amostras na composição de açúcares. Os dados da literatura corroboram com o presente estudo na composição de açúcares que variou em diversidade e quantidade entre os isolados de ureaplasma estudados. Em estudo realizado com *M. pulmonis*, nenhum açúcar diferente de glicose e galactose foi detectado no exopolissacarídeo purificado (DAUBENSPECK et al., 2009). Em outra investigação, foram avaliadas as diferenças entre os açúcares presentes nas frações de polissacarídeos em 11 espécies de micoplasma (*Mycoplasma pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. hominis*, *M. mycoides*, *M. capricolum*, *M.*

*hyorhinae*, *M. arginini*, *M. fermentans* e *Acholeplasma laidlawii*). Observou que, dentre os quatro açúcares avaliados, a glicose foi predominante e a ramnose em menor quantidade. Apenas *M. arthritidis*, *M. capricolum* e *A. laidlawii* possuíam apenas dois tipos de açúcar (DAUBENSPECK, 2009).

Uma cadeia polissacarídica consiste em um número relativamente pequeno de moléculas de açúcar. O polímero pode ser biossintetizado de diferentes maneiras. Algumas vias envolvem enzimas açúcar-específicas para sintetizar o polissacarídeo, e a combinação específica dessas enzimas determina a estrutura do açúcar. Existe similaridade entre *loci* genéticos que sintetizam cadeias de polissacarídeos em regiões altamente variáveis, em que a sequência do polímero está localizada no meio do locus, e é cercada por genes conservados que geralmente têm funções no transporte, montagem, exportação ou síntese de açúcares (YAKOVLIEVA e WALVOORT, 2020; MOSTOWY e HOLT, 2018). Embora a sequência de genes localizados no locus de biossíntese do polissacarídeo seja altamente preditiva para o polissacarídeo expresso, as sequências genéticas nem sempre correlacionam fielmente ao fenótipo. As mutações genéticas dentro desses genes podem alterar a especificidade das enzimas codificadas por eles, alterando assim ligações bioquímicas e produzindo um novo sorotipo. Além disso, genes adicionais localizados fora do locus de síntese podem influenciar ou direcionar a estrutura final do açúcar. Existe uma lacuna crescente entre a diversidade determinada sorologicamente e a diversidade determinada geneticamente. Assim, a caracterização bioquímica de antígenos polissacarídicos permanece importante, e a compreensão da relação complexa entre genótipo e fenótipo nos antígenos polissacarídicos continuam sendo um dos grandes desafios (MANTUANO et al., 2020; ALJOHANI et al., 2019; WEYANT et al., 2018).

Ensaio de ELISA mostraram que nem todos os polissacarídeos inoculados em camundongos induziram a produção de anticorpos. Apenas as amostras ATCC 49782, GOTA e 805 provocaram picos significativos após a inoculação do polissacarídeo. Semelhantemente, estas amostras possuem apenas os açúcares arabinose, xilose, manose, galactose e glicose na sua composição. Daubenspeck e colaboradores (2009) realizaram estudo com mutantes deficientes em EPS e demonstraram que em *M. pulmonis* o exopolissacarídeo não foi necessário para colonização em camundongos. Os eventos genéticos que promovem a diversidade de locais de ligação de anticorpos, a variedade de combinações possíveis, as modificações posteriores e a flexibilidade de muitos carboidratos, requerem variação de estratégias em seu reconhecimento pelos

anticorpos (HAJI-GHASSEMI et al., 2015). As individualidades imunológicas entre os camundongos também poderiam interferir nessa resposta. Porém, em estudo da resposta de anticorpos anti-carboidratos em camundongos Balb/c não houve homogeneidade na resposta de anticorpos a diferentes carboidratos entre animais geneticamente idênticos. Demonstraram que os anticorpos naturais (NAbs) do soro de camundongos BALB/c interagiram com 17% dos glicanos de uma biblioteca de 419 estruturas diferentes de carboidratos. No entanto, apenas sete desses glicanos foram reconhecidos pelo soro dos animais, e outros cinco glicanos por pelo menos 80% dos camundongos (BELLO-GIL et al., 2017).

A maioria dos polissacarídeos são classicamente considerados antígenos independentes de células T, que não induzem a ativação de células T auxiliares para estimular a troca de classe de Ig em células B ou memória imunológica (CRESS et al., 2014). Polissacarídeos bacterianos são fracamente imunogênicos e independentes de células T. Provavelmente a ausência de linfoproliferação na presença de nenhum dos polissacarídeos testados deve-se a este fator. Em ensaios visando o desenvolvimento de vacinas com moléculas semelhantes a estas, os polissacarídeos são acoplados a carreadores de proteínas para induzir células T, anticorpos IgG e células B de memória (HSIEH e ALLEN, 2020). A manose e galactose são pouco imunogênicas, constituindo um bom alvo para o direcionamento de vacinas. O sistema imunológico desempenha papel crítico na prevenção, eliminação e resolução em uma infecção, mas as respostas imunológicas exacerbadas podem contribuir para sintomas deletérios e mortalidade. Especificamente nesses casos, para direcionar os carboidratos aos receptores adequados, é necessário liga-los a proteínas e peptídeos. Podem não apenas se ligar aos seus receptores e ser apresentados por MHC classe II e I, mas também podem induzir a maturação de células dendríticas para células apresentadoras de antígenos profissionais e estimular linfócitos T citotóxicos e secreção de citocinas como IFN-gama. Isto sugere que no desenvolvimento de novas vacinas, porções de carboidratos podem ser úteis na ativação de células imunes e a promoção das respostas imunes inflamatórias (ALJOHANI et al., 2019).

Ademais, vacinas glicoconjugadas, como para *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis*, que são produzidas com polissacarídeos pouco imunogênicos ligados covalentemente à proteínas transportadoras (epítomos de células T), exibem alta eficiência, apesar do alto custo. Além disso, estas vacinas de glicoconjugados são capazes de proteger contra sorotipos específicos, mas a emergência de sorotipos não

vacinais de *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* demonstram a necessidade de atualizações para inclusão de sorotipos (METTU et al., 2020). O mesmo processo é usado em vacinas glicoconjugadas para terapias contra o câncer, onde as moléculas são ligadas à proteínas transportadoras para induzir a resposta imune mediada por células T, sendo que diferentes proteínas transportadoras resultam em diferentes respostas (SUN et al., 2016; COLOMBO et al., 2018).

Neste estudo, os resultados evidenciaram discreta resposta inflamatória durante a exposição experimental aos polissacarídeos de *U. diversum* em macrófagos bovinos. A produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  foi induzida na presença dos diferentes polissacarídeos de isolados de *U. diversum*. A capacidade dos *Mollicutes* promoverem a secreção de citocinas já é conhecida. O estímulo de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, foi relatado em diferentes espécies de ureaplasmas e micoplasmas, como por *U. diversum* (SANTOS-JÚNIOR et al., 2018; MARQUES et al., 2016; SILVA et al., 2016; CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994), *U. urealyticum* (CROUSE et al., 2012; LI et al., 2000a; LI et al., 2000b), *M. fermentans* (GARCIA et al., 1998), *M. hyorhinis* (HEIDEGGER et al., 2015), *M. bovis* (WANG et al., 2016; ZBINDEN et al., 2015), *M. hyopneumoniae* (DAMTE et al., 2015), *M. mycoides subsp. Mycoides* (STERNER-KOCK et al., 2016). A ausência de resposta inflamatória exacerbada pode significar uma atividade protetora dos polissacarídeos capsulares, como demonstrado que em bactérias comensais e patogênicas que modulam o sistema imune inato e adaptativo na microbiota intestinal do hospedeiro (HSIEH e ALLEN, 2020). Neres-Junior e colaboradores (2018) demonstraram que a exposição de macrófagos bovinos a diferentes cepas de *U. diversum* levava ao aumento da expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , além do reconhecimento pelo TLR2. Isso sugere que apenas o polissacarídeo capsular não seja capaz de promover resposta imune intensa no hospedeiro. Alguns estudos descrevem que as respostas inflamatórias com as demais respostas imunes do hospedeiro podem provocar manifestações clínicas resultantes de danos celulares (AMORIM et al., 2014). O sinergismo entre moléculas de superfície e a produção de citocinas pró-inflamatórias sugere que as lipoproteínas e constituintes lipídicos de micoplasmas ativam os macrófagos por diferentes mecanismos (BROWNING et al., 2011). As etapas iniciais de interação entre os macrófagos e as moléculas de superfície são diferentes, mas as vias de tradução dos sinais intracelulares parecem ser semelhantes, na maioria das vezes envolvendo o TLR2 (RAZIN, YOGEV e NAOT,

1998; ROMAN-ROMAN e RAWADI, 1996; USHIDA et al., 2013; WANG et al., 2016).

Com o reconhecimento específico de moléculas dos micro-organismos, os TLR's ativam fatores de transcrição, induzem a liberação de citocinas e expressão de moléculas co-estimulatórias, preparando as células para a ativação e expansão de células antígeno-específicas (XIA et al., 2021; JUAREZ et al, 2010; HANKE e KIELIAN, 2011; KAWAI e AKIRA, 2011). No presente estudo, verificou-se que apenas a presença do polissacarídeo capsular não promove o reconhecimento pelos TLR2 e 4 por nenhuma das amostras estudadas. Em estudo anterior, o estímulo foi dependente da quantidade de ureaplasmas inoculados na cultura celular, e nas maiores concentrações da cepa ATCC 49782 que também ativaram TLR4 (NERES-JUNIOR et al., 2018). A literatura demonstra que o TLR2 tem sido considerado o principal receptor para a resposta imune aos *Mollicutes* (SILWEDEL et al., 2019; BROWNING et al., 2011). Um estudo realizado pela infecção de macrófagos com *U. urealyticum*, demonstrou a ativação de TLR2 e TLR4 (PELTIER et al, 2007). O complexo TLR2-TLR6 também foi verificado por desempenhar importante papel no mecanismo de patogenicidade dos micoplasmas através das suas lipoproteínas diaciladas (UCHIDA et al., 2013). No entanto, o papel de TLR2 ainda não é bem elucidado. Love et al. (2010) realizaram estudo com infecção de células HEK TLR-transfectadas e camundongos TLR2 nocaute infectados por *M. pulmonis*. Observaram que após a infecção, os níveis de *M. pulmonis* nos pulmões dos camundongos foram elevados e houve produção de citocinas, indicando que mecanismos independentes de TLR 2 também podem estar envolvidos na resposta imune do hospedeiro. Outro estudo utilizando as linhagens A2EN e ShEN101, de células endocervicais humanas, infectadas com *M. genitalium* também evidenciou a secreção de citocinas inflamatórias e estímulo de TLR3 (MCGOWIN et al., 2012).

Os resultados do presente estudo demonstram que, apesar de não haver aumento da expressão gênica de iNOS após a exposição experimental, os polissacarídeos capsulares de *U. diversum* induziram a secreção de nitrito pelos macrófagos bovinos. Tal habilidade não foi dose dependente. O mesmo foi observado durante a infecção experimental por *U. urealyticum* em sêmen humano (QUIAN et al., 2016) e em macrófagos murinos (CROUSE et al., 1998). *Ureaplasma parvum* promoveu a secreção de iNOS em macrófagos peritoneais murinos experimentalmente infectados (UCHIDA et al., 2013). A expressão da iNOS é o resultado da resposta inflamatória localizada ou difusa resultante da infecção ou dano tecidual. A isoforma II ou óxido nítrico-sintase

induzida (iNOS) pode ser ativada por citocinas e lipopolissacarídeos ou endotoxinas bacterianas, juntamente com citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IFN- $\gamma$ . A indução da síntese de iNOS, pode ocorrer de 2 a 4 horas após a exposição ao agente. O óxido nítrico pode ser formado na parede vascular pela iNOS. A quantidade de NO produzida pode determinar sua proteção ou toxicidade. Embora pequenas quantidades sejam necessárias para a homeostasia, grandes quantidades, como aquelas produzidas na ativação da iNOS são citotóxicas. Porém, a produção de grandes quantidades de NO pode ser importante na defesa contra invasores celulares (CINELLI et al., 2020; XUE et al., 2018).

Em estudo anterior, observou-se que a infecção por micoplasma induz estresse oxidativo e danos ao DNA por oxidação, apesar de ainda não se conhecer os mecanismos desta resposta (JI et al., 2019). *Mycoplasma pneumoniae* também pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio após a infecção (BENEDETTI et al., 2020). Assim, quando a resposta inflamatória é parte da resposta adaptativa (isto é, infecção ou sepse), a expressão de iNOS é benéfica. Quando a expressão da iNOS é parte da inflamação exacerbada, a expressão de iNOS pode ser nociva. Do lado benéfico, a expressão da iNOS resulta em inibição do crescimento de patógenos microbianos. A indução do iNOS de alto rendimento geralmente ocorre em ambiente oxidativo e, portanto, altos níveis de NO têm a oportunidade de reagir com superóxido, produzindo peroxinitrito e toxicidade celular. Essas propriedades podem definir os papéis da iNOS na imunidade do hospedeiro, permitindo sua participação em atividades antimicrobianas e antitumorais como parte da resposta oxidativa dos macrófagos (*M. bovis* pode escapar da ação do sistema imunológico do hospedeiro evitando a fagocitose e inibindo a proliferação de neutrófilos e a secreção de óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), induzindo monócitos a produzirem fatores anti-inflamatórios, Assim, ocorre a apoptose de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), inibindo sua resposta proliferativa e resultando em sua invasão. Estas condições levam à infecção crônica por *M. bovis* (ASKAR et al., 2021).

Os polissacarídeos bacterianos geralmente não geram uma forte resposta imunológica, mas sua ligação a uma proteína transportadora pode aumentar significativamente sua antigenicidade. Carboidratos puros, especialmente polissacarídeos, normalmente ativam células B, levando à produção de anticorpos (IgM) com baixa afinidade e de curta duração. Em contraste, os antígenos proteicos ativam sinais adicionais, facilitando a mudança de classe de anticorpos para IgGs de maior

afinidade e longa duração. Consequentemente, os anticorpos produzidos a partir de carboidratos e proteínas são geralmente classificados como de células T independentes e de células T dependentes, respectivamente (salvo exceções). O uso de pequenos peptídeos como componentes antigênicos de vacinas tem sido prejudicado pela baixa imunogenicidade, desempenho, baixa biodisponibilidade e uso de adjuvantes. Curiosamente, quando as duas biomoléculas estão covalentemente ligadas para formar um conjugado, o componente de proteína pode desencadear a ajuda de células T para células B anti-carboidratos, produzindo IgGs anti-carboidratos. Este é o princípio das vacinas de glicoconjugado, amplamente utilizado para melhorar as respostas imunológicas contra antígenos de carboidratos sendo fundamental para a proteção do sistema imunológico imaturo de crianças pequenas (MANTUANO et al., 2020; WEYANT et al., 2018; SNAPPER e MOND, 1996).

Compreender quais funções a cápsula desempenha em diferentes cepas é fundamental para identificação dos tipos de polissacarídeos que representam os melhores alvos para novas vacinas ou para o desenvolvimento de antimicrobianos e testes de diagnóstico. Embora a cápsula represente um importante fator de virulência de *U. diversum*, existem dados limitados disponíveis sobre as suas diferentes funções no estabelecimento de infecções. Para desenvolver vacinas eficazes e terapias direcionadas ao CPS, devemos primeiro obter uma compreensão abrangente dos mecanismos envolvidos em sua síntese e expressão. Esta pesquisa precisa ser abordada no contexto da variação entre os sorotipos encontrados em *U. diversum*, para garantir que as intervenções potenciais funcionem contra as cepas que produzem diversas estruturas. Mais estudos sobre o polissacarídeo capsular são necessários para fornecer uma base de dados para o desenvolvimento de medidas preventivas e de tratamentos contra este patógeno bovino persistente e que causa tantos prejuízos.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As análises de bioinformática das sequências do gene da glicosiltransferase *Ureaplasma diversum* demonstraram que a sequência não possui características de antigenicidade mas a sua capacidade de ligação a alelos de MHCI pode ser relevante para aplicações de imunodeteção e imunoterapia.
- As sequências do gene da glicosiltransferase e a composição do polissacarídeo capsular dos isolados de *Ureaplasma diversum* possuem variações que podem relacionar com mecanismos de variação antigênica e de escape a resposta imune.
- Em camundongos, nem todos os polissacarídeos capsulares dos isolados de *Ureaplasma diversum* geraram respostas de anticorpos, evidenciando as individualidades imunológicas e possíveis variações de estratégias em seu reconhecimento por anticorpos.
- O polissacarídeo capsular de *Ureaplasma diversum* pode promover uma resposta inflamatória discreta, com a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , em macrófagos bovinos. Este pode ser um mecanismo relacionado aos danos provocados pela infecção ou participação de uma modulação imune que permita a persistência intracelular da espécie.
- O reconhecimento do polissacarídeo capsular isolado de *Ureaplasma diversum* não ativou TLR2 nem TLR4 em macrófagos bovinos. Isso sugere que apenas o polissacarídeo capsular não seja capaz de promover resposta imune intensa no hospedeiro e modulação da resposta imune.
- A secreção de nitrito foi estimulada em macrófagos bovinos na presença do polissacarídeo capsular de *Ureaplasma diversum*, mas não houve correlação com a expressão gênica de iNOS, o que está de acordo com o perfil de resposta inflamatória associado.
- *Ureaplasma diversum* invade blastocistos bovinos, sem causar efeitos citopáticos, demonstrando que, como consequência dessa invasão, este micro-organismo pode persistir infectando tais células, impedindo a implantação embrionária ou causando danos futuros ao feto.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ABOKLAISH, A. F. et al. Differential recognition of the multiple banded antigen isoforms across *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* species by monoclonal antibodies. **J Microbiol Methods**, v. 127, p. 13-19, 08 2016. ISSN 1872-8359. 2016
- ADRIO J-L, DEMAIN AL. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered bugs*. 2010;1(2):116-31. 2010.
- ALJOHANI S, HUSSEIN WM, TOTH I, SIMERSKA P. Carbohydrates in Vaccine Development. **Curr Drug Deliv**. 2019;16(7):609-617. 2019.
- ALMEIDA, R. A.; WANNEMUEHLER, M. J.; ROSENBUSCH, R. F. Interaction of *Mycoplasma dispar* with bovine alveolar macrophages. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 7, p. 2914-9, 1992.
- AMARAL, W. N. **Soroprevalência de mycoplasma em pacientes com esterilidade feminina**. 2003. 79p. Dissertação (Mestrado) - Instituto De Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.
- AMORIM, A. T. et al. Apoptosis in HEp-2 cells infected with *Ureaplasma diversum*. **Biol. Res.**, v. 47, p. 38, 2014.
- ANDERSEN, H. P; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Sci**. 15:2558-2567, 2006.
- ANDRADE, J. R. A. et al. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.**, Minas Gerais. n.57, 6p, 2005.
- ANDRÉS, E.; MARTÍNEZ, N.; PLANAS, A. Expression and characterization of a *Mycoplasma genitalium* glycosyltransferase in membrane glycolipid biosynthesis: potential target against mycoplasma infections. **J Biol Chem**, v. 286, n. 41, p. 35367-79, Oct 2011. ISSN 1083-351X. 2011.
- ASKAR, H.; CHEN, S.; HAO, H.; YAN, X.; MA, L.; LIU, Y.; CHU, Y. Immune Evasion of *Mycoplasma bovis*. **Pathogens**, 10, 297. 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Beef Report-Perfil da pecuária no Brasil**. P 1-40. 2020.
- BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.
- BEAMAN, K. D.; POLLACK, J. D. Synthesis of adenylate nucleotides by *Mollicutes (mycoplasmas)*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, n. 10, p. 3103-10, 1983.

---

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

BELLO-GIL D, KHASBIULLINA N, SHILOVA N, BOVIN N AND MAÑEZ R Repertoire of BALB/c Mice Natural Anti-Carbohydrate Antibodies: Mice vs. Humans Difference, and Otherness of Individual Animals. **Front. Immunol.** 8:1449. 2017.

BENEDETTI, F.; CURRELI, S.; ZELLA, D. Mycoplasmas–Host Interaction: Mechanisms of Inflammation and Association with Cellular Transformation. **Microorganisms** 8, 1351. 2020.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 26-31, 2009.

BERGEY, D. H. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: \_\_\_\_\_2. ed. **Manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, v. 4, 721 p. 2010.

BERTIN C, PAU-ROBLOT C, COURTOIS J, MANSO-SILVA N L, THIAUCOURT F, et al. Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*. **PLoS ONE** 8(7): e68373. 2013.

BERTIN C, PAU-ROBLOT C, COURTOIS J, MANSO-SILVÁN L, TARDY F, POUMARAT F, CITTI C, SIRAND-PUGNET P, GAURIVAUD P, THIAUCOURT F. Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster. **Appl Environ Microbiol** 81:676–687. 2015.

BEY, I. **Les ureaplasmes en pathologie bovine: Epidémiologie, diagnostic et mesures de contrôle**. 2006. 90 p. Université Claude-Bernard. Lyon. França. [THESE]. v.I, n.19, 2006.

BIELANSKI, A. et al. Isolation of *Mycoplasma bovis* from intact and microinjected preimplantation bovine embryos washed or treated with trypsin or antibiotics. **J. In Vitro Fert. Embryo Transf.**, v. 6, n. 4, p. 236-41, 1989.

BIELANSKI, A.; DEVENISH, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* in semen on fertilization and association with in vitro produced morula and blastocyst stage embryos. **Theriogenology**, v. 53, n. 6, p. 1213-23, 2000.

BRENDEL, V.; BUCHER, P.; NOURBAKHSI, I. R.; BLAISDELL, B. E.; KARLIN, S. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 6, p. 2002–2006, 1992.

BRITTON, A. P. et al. Protein A gold identification of ureaplasmas on the bovine zona pellucida. **Can. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 2, p. 172-5, 1989.

BRITTON, A. P. et al. In vitro exposure of bovine morulae to *Ureaplasma diversum*. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 2, p. 198-203, 1987.

- BROMFIELD, J. J. et al. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Uterine infection: linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. **J. Anim. Sci.**, v. 93, n. 5, p. 2021-33, 2015.
- BROWNING, G. F. et al. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. **Vet. Microbiol.**, v. 153, n. 1-2, p. 44-50, 2011.
- BUZINHANI, M. et al. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozoids. **BMC Res. Notes**, v. 4, p. 455, 2011.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 59:1368-1375. 2007.
- CAMPANERO-RHODES MA, PALMA AS, MENÉNDEZ M AND SOLÍS D. Microarray Strategies for Exploring Bacterial Surface Glycans and Their Interactions With Glycan-Binding Proteins. **Front. Microbiol.** 10:2909. 2020.
- CARDOSO, M. V. et al. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. **Vet. Microbiol.**, v. 72, n. 3-4, p. 241-50, 2000.
- CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros - Artigo de revisão. **Arq. do Inst. Biol.** São Paulo. v.71, n.2, p.257-265, 2004.
- CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 493-9, 1999.
- CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. **FEMS Microbiology Reviews**, fux048, 41, 723–750, 2017.
- CHANG CCH, SONG J, TEY BT, RAMANAN RN. Bioinformatics approaches for improved recombinant protein production in *Escherichia coli*: protein solubility prediction. **Briefings in bioinformatics.** 15(6):953-62. 2014.
- CHANG, H. Y. et al. Processing is required for a fully functional protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding and cytoadherence. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 20, p. 5841-6, 2011.
- CHAUDHRY R, NISAR N, HORA B, CHIRASANI SR, MALHOTRA P. Expression and immunological characterization of the carboxy-terminal region of the P1 adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae*. **J Clin Microbiol.** 2005;43(1):321-5. 2005.
- CHAUDHURI, R.; KULSHRESHTHA, D.; RAGHUNANDANAN, M. V.; RAMACHANDRAN, S. Integrative immunoinformatics for *Mycobacterial* diseases in R platform. **Syst Synth Biol.** V. 8, pp. 27–39, 2014.
- CHELMONSKA-SOYTA, A. et al. Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. **Can. J. Vet. Res.**, v. 58, n. 4, p. 275-80, 1994.

CHEN, S. et al. Genome-Wide Analysis of the First Sequenced. G3 (Bethesda), v. 7, n. 9, p. 2899-2906, 09 2017. ISSN 2160-1836. 2017.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.** 47:45-148, 1978.

CINELLI MA, DO HT, MILEY GP, SILVERMAN RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Med Res Rev.** Jan;40(1):158-189. 2020.

CITTI, C.; BARANOWSKI, E., DORDET-FRISONI, E.; FAUCHER, M.; NOUVEL, L. X. Genomic Islands in Mycoplasmas. **Genes**, 11, 836; 2020.

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

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

COLOMBO C, PITIROLLO O, LAY L. Recent Advances in the Synthesis of Glycoconjugates for Vaccine Development. **Molecules.** 2018 Jul 13;23(7):1712. 2018.

COMSTOCKAND, L. E.; KASPER, D. L. Bacterial Glycans: Key Mediators of Diverse Host Immune Responses. **Cell** 126, 2006.

CRANE, M. B.; HUGHES, C. A. Can *Ureaplasma diversum* be transmitted from donor to recipient through the embryo? Two case reports outlining *U. diversum* losses in bovine embryo pregnancies. **Can Vet J**;59:43–46. 2018.

CRESS BF, ENGLAENDER JA, HE W, KASPER D, LINHARDT RJ, KOFFAS MA. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiol Rev.** 38(4):660-97. 2014.

CROUSE, D. T. et al. Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line. **Pediatr. Res.**, v. 44, n. 5, p. 785-90, 1998.

CSERZO, M.; EISENHABER, F.; EISENHABER, B.; SIMON, I. On filtering false positive transmembrane protein predictions. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 15, n. 9, p. 745–752, 2002.

DAMTE, D. et al. Sonicated Protein Fractions of *Mycoplasma hyopneumoniae* Induce Inflammatory Responses and Differential Gene Expression in a Murine Alveolar Macrophage Cell Line. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, n. 12, p. 2153-9, 2015.

DANDO, S. J. et al. 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. e29856, ISSN 1932-6203. 2012.

DAUBENSPECK, J. M. et al. Identification of exopolysaccharide-deficient mutants of *Mycoplasma pulmonis*. **Mol Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 1235-45. ISSN 1365-2958. 2009.

DAVID, Y.; BROWNING, G. F.; WISE, K. S. Genetic mechanisms of surface variation. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Eds.). **Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas**. New York, USA: Kluwer academic, 2002.

DENG, F., MCCLURE, M., RORIE, R. *et al.* The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. **J Animal Sci Biotechnol** **10**, 92 2019.

DÍAZ, J.M.; PRIETO, A.; LÓPEZ, G.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; QUINTELA, L.A.; MORRONDO, P. FERNÁNDEZ, G. Association of *Ureaplasma diversum* with reproductive disease in cattle, **New Zealand Veterinary Journal**, 67:5, 249-256, 2019.

DISNEY, M.D.; SEEBERGER, P.H. The Use of Carbohydrate Microarraysto Study Carbohydrate-Cell Interactions and to Detect Pathogens. **Chemistry & Biology**, Vol. 11, 1701–1707, 2004.

DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; PALMER, N. C. Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. **Can. J. Comp. Med.**, v. 44, n. 3, p. 252-8, 1980.

DORDET-FRISONI E, FAUCHER M, SAGNÉ E, BARANOWSKI E, TARDY F, NOUVEL LX AND CITTI C Mycoplasma Chromosomal Transfer: A Distributive, Conjugative Process Creating an Infinite Variety of Mosaic Genomes. **Front. Microbiol.** 10:2441. 2019.

DORDET-FRISONI E, SAGNÉ E, BARANOWSKI E, BRETON M, NOUVEL LX, BLANCHARD A, MARENDA MS, TARDY F, SIRAND-PUGNET P, CITTI C. Chromosomal transfers in mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. **mBio** 5(6):e01958-14. 2014.

DROZDETSKIY, A.; COLE, C.; PROCTER, J.; BARTON, G. J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 1, p. 389–394, 1 jul. 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington-DC , v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

DUDEK, K.; NICHOLAS, R.A.J.; SZACAWA, E.; BEDNAREK, D. Mycoplasma bovis Infections—Occurrence, Diagnosis and Control. **Pathogens**, 9, 640; 2020.

DYBVIG, K.; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 25-57, 1996.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M.; STEWART, R. B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. Haemophilus somnus, Mycoplasma spp. and Ureaplasma spp., Chlamydia; Pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. **Vet. Bull.**, v.62, p.887-910, 1992.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing 37 antibody by a virus-specific synthetic peptide. **J Virol.** 55:836-839, 1985.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J. Comp. Pathol.**, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, 2002.

FAN, H.H. et al. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.39, n.4, p.729-735, 1995.

FLANNERY, A.; GERLACH, J.Q.; JOSHI, L.; KILCOYNE, M. Assessing Bacterial Interactions Using Carbohydrate-Based Microarrays. **Microarrays**, 4, 690-713; 2015.

FOX, L. K. et al. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma sp.* in milk. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 50, n. 5, p. 235-40, 2003.

FRITZEN JTT, MORETTIN AB, LORENZETTI E, ALFIERI AF, ALFIERI AA. Bovine viral diarrhoea virus subgenotype 1a in a mummified fetus from a Brazilian dairy cattle herd. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 33(5):966-968. 2021.

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Manual De Utilização De Animais. **CEUA-FIOCRUZ**. 2008.

GAETI, J. G., LANA, M. V., SILVA, G. S., LERNER, L., DE CAMPOS, C. G., HARUNI, F., et al.. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. **Trop Anim Health Prod**, 46(6), 1059-1063. 2014.

GAMBARINI, M. L. et al. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: role of *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma diversum* and BHV-1. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 41, n. 7, p. 1421-6, 2009.

GARCIA, J. et al. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 51, p. 34391-8, 1998.

GARCIA, M., et al., The effect of citrus-derived oil on bovine blood neutrophil function and gene expression in vitro. **J Dairy Sci**, 98(2): p. 918-26. 2015.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., B. A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005.

GAURIVAUD P, BARANOWSKI E, PAU-ROBLOT C, SAGNÉ E, CITTI C, TARDY F. *Mycoplasma agalactiae* secretion of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan, a rare polysaccharide in prokaryotes, is governed by high-frequency phase variation. **Appl Environ Microbiol** 82:3370–3383. 2016.

GONDAIRA, S. et al. Cytokine mRNA profiling and the proliferative response of bovine peripheral blood mononuclear cells to *Mycoplasma bovis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 165, n. 1-2, p. 45-53, 2015.

- GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 19, n. 1, p. 199-221, 2003.
- GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 2, p. 695–699, 2010.
- GROSJEAN H, BRETON M, SIRAND-PUGNET P, TARDY F, THIAUCOURT F, et al. Predicting the Minimal Translation Apparatus: Lessons from the Reductive Evolution of Mollicutes. **PLoS Genet** 10(5): e1004363. 2014.
- GUO JH, JIA R, FAN MW, BIAN Z, CHEN Z, PENG B. Construction and immunogenic characterization of a fusion anti-caries DNA vaccine against PAc and glucosyltransferase I of *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**. Mar;83(3):266-70. 2004.
- HAJI-GHASSEMI O, BLACKLER RJ, MARTIN YOUNG N, EVANS SV. Antibody recognition of carbohydrate epitopes†. **Glycobiology**. 2015 Sep;25(9):920-52. 2015.
- HANKE, M. L.; KIELIAN, T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 121, n. 9, p. 367-87, 2011.
- HANSEN AM, RASMUSSEN M, SVITEK N, HARNDAHL M, GOLDE WT, BARLOW J, et al. Characterization of binding specificities of bovine leucocyte class I molecules: impacts for rational epitope discovery. **Immunogenetics**. 66(12):705-18. 2014.
- HANSEN, P. J.; SOTO, P.; NATZKE, R. P. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 51, n. 4, p. 294-301, 2004.
- HAZELTON, M.S.; MORTON, J.M. ; BOSWARD, K.L.; SHEEHY, P.A.; PARKER, A.M.; DWYER, C.J. ; NIVEN, P.G. ; HOUSE, J.K.. Mycoplasma species in vaginas of dairy cows before and after exposure to bulls and their association with conception, **Journal of Dairy Science**, Volume 103, Issue 12, Pages 11795-11805, ISSN 0022-0302, 2020.
- HEIDEGGER, S. et al. *Mycoplasma hyorhinis*-Contaminated Cell Lines Activate Primary Innate Immune Cells via a Protease-Sensitive Factor. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142523, 2015.
- HOBSON, N.; CHOUSALKAR, K. K.; CHENOWETH, P. J. *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: its detection and potential effects. **Aust. Vet. J**, v. 91, n. 11, p. 469-73, 2013.
- HOSHINO T, KONDO Y, SAITO K, TERAOKA Y, OKAHASHI N, KAWABATA S, FUJIWARA T. Novel epitopic region of glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*. **Clin Vaccine Immunol**. 2011 Sep;18(9):1552-61. 2011.
- HSIEH SA; ALLEN PM. Immunomodulatory Roles of Polysaccharide Capsules in the Intestine. **Front. Immunol**. 11:690. 2020.



IETS. Conclusions of the Research Subcommittee of the International Embryo Transfer Society (IETS) **Import/Export Committee**. Denver (United States of America), 14 January 1992. *Rev. Sci. Tech.*, v. 11, n. 3, p. 937-42, 1992.

ITOH, M.; FURUOKA, M.; BABA, Y.; SAITOH, T.; HATA, E.; HIRANO, Y.; SENNA, K.; YAMADA, K. Relationship between genital carriage and udder infection with *Mycoplasma bovis* in dairy farms. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 69(1), 83-87. 2021.

JESPERSEN MC, PETERS B, NIELSEN M, MARCATILI P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*. 2017;45(W1):W24-W9. 2017.

JI, Y.; KARBASCHI, M.; COOKE, M.S. *Mycoplasma* infection of cultured cells induces oxidative stress and attenuates cellular base excision repair activity. **Mutat Res**. September ; 845: 403054.2019.

JUAREZ, E. et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. **Respir. Res.**, v. 11, p. 2, 2010.

KÄLL L, KROGH A, SONNHAMMER EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*. 2004;338(5):1027-36.2004.

KAMMINGA T, KOEHORST JJ, VERMEIJ P, SLAGMAN SJ, MARTINS DOS SANTOS VA, BIJLSMA JJ AND SCHAAP PJ. Persistence of Functional Protein Domains in *Mycoplasma* Species and their Role in Host Specificity and Synthetic Minimal Life. **Front. Cell. Infect. Microbiol**. 7:31. 2017.

KAUR J, KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International journal of biological macromolecules*. 2018;106:803-22. 2018.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 373-84, 2010.

KLEMENT, M. L. et al. A processive lipid glycosyltransferase in the small human pathogen *Mycoplasma pneumoniae*: involvement in host immune response. **Mol Microbiol**, v. 65, n. 6, p. 1444-57, ISSN 0950-382X. 2007.

KNOX, C. L. et al. The severity of chorioamnionitis in pregnant sheep is associated with in vivo variation of the surface-exposed multiple-banded antigen/gene of *Ureaplasma parvum*. **Biol Reprod**, v. 83, n. 3, p. 415-26, Sep 2010.

KONG, F.; GILBERT, G. L. Postgenomic taxonomy of human ureaplasmas -- a case study based on multiple gene sequences. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 5, p. 1815-21, Sep 2004.

KOZLOVA, A.D.; GORBACHEVA, N.S.; HAYEROVA, R.F.; KRASNIKOVA, M.; LAZAREVA, E.A.; YATSENTYUK, S. Differentiation of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* and identification of

- Ureaplasma diversum by real-time PCR. **sel'skokhozyaistvennaya Biologiya**. 54. 378-385. 2019.
- KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. . Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.
- KUNDSIN, R. B.; PARRENO, A.; POULIN, S. Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of *Ureaplasma urealyticum* from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 445-53, 1978.
- LAIRSON, L. L. et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 521-55, ISSN 0066-4154. 2008.
- LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**. 2:2, 2006.
- LEMOIS JA, PALMER SR, ZENG L, WEN ZT, KAJFASZ JK, FREIRES IA, ABRANCHES J, BRADY LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Spectr**. Jan;7(1): 2019.
- LEWANDOWSKA-SABAT, A. M. et al. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus* in vitro. **BMC Genomics**, v. 14, p. 891, 2013.
- LI, L.; KRISHNAN, M.; BASEMAN, J. B.; KANNAN, T. R. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of a Ca<sup>2+</sup>-Dependent, Membrane-Associated Nuclease of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of bacteriology**. V. 192, n. 19, pp. 4876–4884, 2010.
- LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T.; MCWILLIAM, H.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; LOPEZ, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic acids research**, v. 43, p. 580–584, 2015.
- LIVAK, K.J. AND T.D. SCHMITTGEN, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. **methods**, **25**(4): p. 402-408. 2001.
- LOVE, W. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a major role in innate resistance in the lung against murine Mycoplasma. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10739, 2010.
- LYSNYANSKY, I.; RON, Y.; YOGEV, D. Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 19, p. 5698-708. ISSN 0021-9193. 2001.
- MANTUANO, N.R., NATOLI, M., ZIPPELIUS, A., & LÄUBLI, H. Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**, 8(2), e001222. 2020.
- MARQUES, L. M. et al. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum*. **Vet Microbiol**, v. 167, n. 3-4, p. 670-4, Dec 2013. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993254> >.

MARQUES, L. M. **Estudo da variabilidade genética e dos fatores de virulência de isolados de *Ureaplasma diversum***. 2009. Tese (Doutorado). São Paulo: USP, 2009.

MARQUES, L. M. et al. *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, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27603136> >.

MARQUES, L. M. et al. Intraspecific sequence variation in 16S rRNA gene of *Ureaplasma diversum* isolates. **Vet Microbiol**, v. 152, n. 1-2, p. 205-11, Aug 2011. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21601382> >.

MARQUES, L. M. et al. Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 83, 2010. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236540> >.

MARQUES, L. M. et al. Invasion of *Ureaplasma diversum* in Hep-2 cells. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 83, 2010.

MARQUES, L. M. et al.. Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782. **Genome Announc**, v. 3, n. 2, 2015. ISSN 2169-8287. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883297> >.

MAUNSELL FP, WOOLUMS AR, FRANCOZ D, ROSENBUSCH RF, STEP DL, WILSON DJ, JANZEN ED. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. **J Vet Intern Med**. Jul-Aug;25(4):772-83. 2011.

MCGOWIN, C. L. et al. Persistent *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 11, p. 3842-9, 2012.

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

METTU R, CHEN CY, WU CY. Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. **J Biomed Sci**. Jan 3;27(1):9. doi: 10.1186/s12929-019-0591-0. 2020.

MICOLI, F.; COSTANTINO, P.; ADAMO, R. Potential targets for next generation antimicrobial glycoconjugate vaccines, **FEMS Microbiology Reviews**, Volume 42, Issue 3, , Pages 388–423, 2018.

MILLER, R. et al. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 10, n. 3, p. 479-90, 1994.

MISTOU MY, SUTCLIFFE IC, VAN SORGE NM. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiol Rev**.40(4):464-79. 2016.

MOHAMMADI S, MOSTAFAVI-POUR Z, GHASEMI Y, BARAZESH M, POUR SK, ATAPOUR A, et al. In silico analysis of different signal peptides for the excretory

production of recombinant NS3-GP96 fusion protein in *Escherichia coli*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. 2019;25(4):1279-90. 2019.

MOREMEN, K.W.; HALTIWANGER, R. S. Emerging structural insights into glycosyltransferase-mediated synthesis of glycans. *Nat Chem Biol*. 15(9): 853–864. 2019.

MOSTOWY, R.J.; HOLT, K.E. Diversity-Generating Machines: Genetics of Bacterial Sugar-Coating. **Trends in Microbiology**, Vol. 26, No. 12, 2018.

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

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R.L. Patologias do útero gestante. In: \_\_\_\_\_. - **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 70-89.

NASCIMENTO, M. G. F. et al. Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. **Acta. Scien. Vet.**, n.33, p.195-199. 2005.

NICHOLAS, R. A.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Res. Vet. Sci**, v. 74, n. 2, p. 105-12, 2003.

NICHOLAS, R. A.; AYLING, R. D.; MCAULIFFE, L. Vaccines for *Mycoplasma* diseases in animals and man. **J. Comp. Pathol.**, v. 140, n. 2-3, p. 85-96, 2009.

NICHOLAS, R.A.J. et al. *Mycoplasmas* in adult cattle: Bugs worth bothering about? **Ir. Vet. J.**, v.59, n.10, 2006.

NIELSEN M, CONNELLEY T, TERNETTE N. Improved Prediction of Bovine Leucocyte Antigens (BoLA) Presented Ligands by Use of Mass-Spectrometry-Determined Ligand and in Vitro Binding Data. **J Proteome Res**.17(1):559-67. 2018.

OLIVEIRA-FILHO, B. D. et al. *Ureaplasma diversum* isolation from vaginal mucus of repeat breeders dairy cows in Alagoas state – Brazil. **Arch. of Vet. Scie**. 10:151-156. 2005.

PARALANOV, V. et al. Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 88, May 2012. ISSN 1471-2180. 2012.

PARALANOV, V. **Molecular and bioinformatics approaches to redefine our understanding of ureaplasmas: moving beyond serovars**. 2014. Tese (Doutorado). Maryland: University of Maryland, 2014.

PARK, S.; GILDERSLEEVE, J.C.; BLIXT, O.; SHIN, I. Carbohydrate microarrays. **Chem Soc Rev**. 21; 42(10): 4310–4326.2013.

PARKER AM, HOUSE JK, HAZELTON MS, BOSWARD KL, SHEEHY PA Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk, semen and swab samples. **PLoS ONE** 12(3): e0173422. 2017.

PELLE R, GRAHAM SP, NJAHIRA MN, OSASO J, SAYA RM, ODONGO DO, et al. Two *Theileria parva* CD8 T cell antigen genes are more variable in buffalo than cattle parasites, but differ in pattern of sequence diversity. **PloS one**. 6(4). 2011.

PELTIER, M. R. et al. Characterization of the macrophage-stimulating activity from *Ureaplasma urealyticum*. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 57, n. 3, p. 186-92, 2007.

PERSSON A, JACOBSSON K, FRYKBERG L, JOHANSSON KE, POUMARAT F. Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. **J Bacteriol**. 2002.

PIMENTEL ZT, DUFAULT-THOMPSON K, RUSSO KT, SCRO AK, SMOLOWITZ RM, GOMEZ-CHIARRI M, ZHANG Y. Microbiome analysis reveals diversity and function of Mollicutes associated with the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **mSphere** 6:e00227-21. 2021.

PITCHER, D. G.; NICHOLAS, R. A. *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction? **Vet. J.**, v. 170, n. 3, p. 300-6, 2005.

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

POTTER, T. J. et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 127-34, 2010.

QIAN, L. et al. Effects of *Ureaplasma urealyticum* Infection on Sperm Quality and Concentrations of Nitric Oxide and Cytokine in the Semen of Infertile Males. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 75, n. 6, p. 605-8, 2016.

RAINEY K, MICHALEK SM, WEN ZT, WU H. Glycosyltransferase-mediated biofilm matrix dynamics and virulence of *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol** 85:e02247-18. 2019.

RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. **Biosci. Rep.**, v. 19, n. 5, p. 367-72, 1999.

RAZIN, S. Mycoplasmas: general concepts. In: \_\_\_\_\_. **Medical microbiology**. San Diego: Academic Press, 2004. p. 425-474. 2 v.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-90, 2010.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Mycoplasma adhesion. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, n. 3, p. 407-22, 1992.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1094-156, 1998.

REN, Z., CHEN, L., LI, J., LI, Y. Inhibition of *Streptococcus mutans* polysaccharide synthesis by molecules targeting glycosyltransferase activity. *Journal of oral microbiology*, 8, 31095. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.31095>. 2016.

REZENDE, I. S. **Resposta de macrófagos e blastocistos bovinos após a exposição a *Ureaplasma diversum***. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 285-315, 1996.

ROBINSON, J. W. et al. *Ureaplasma parvum* serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62746, 2013. ISSN 1932-6203.2013.

ROMAN-ROMAN, S.; RAWADI, G. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 2, p. 637-43, 1996.

ROSANO GL, CECCARELLI EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 5:172. 2014.

ROSENGARTEN, R. et al. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, n. 1, p. 15-25, 2000.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 2, p. 417-32, 2003.

RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W., ROSENBUSCH, R. F., LAUERMAN, L. H. (Eds.), **Mycoplasmosis in Animals: laboratory diagnosis**. Iowa: Iowa State University Press, Ames, 1994. p. 141-144. 1994.

RURANGIRWA, F.R.; McGUIRE, T.C.; MAGNUSON, N.S.; KIBOR, A.; CHEMA, S. Composition of a polysaccharide from mycoplasma (F-38) recognised by antibodies from goats with contagious pleuropneumonia, **Research in Veterinary Science**, Volume 42, Issue 2, 1987.

SANTOS JUNIOR MN, MACÊDO NERES NSD, CAMPOS GB, BASTOS BL, TIMENETSKY J AND MARQUES LM. A Review of *Ureaplasma diversum*: A Representative of the Mollicute Class Associated With Reproductive and Respiratory Disorders in Cattle. **Front. Vet. Sci.** 8:572171. 2021.

SANTOS JUNIOR MN, SANTOS RS, NEVES WS, FERNANDES JM, DE BRITO GUIMARÃES BC, BARBOSA MS, SILVA LSC, GOMES CP, REZENDE IS, OLIVEIRA CNT, DE MACÊDO NERES NS, CAMPOS GB, BASTOS BL, TIMENETSKY J, MARQUES LM. Immunoinformatics and analysis of antigen distribution of *Ureaplasma diversum* strains isolated from different Brazilian states. **BMC Vet Res.** 7;16(1):379.2020.

Santos-Junior MN, Rezende IS, Souza CLS, Barbosa MS, Campos GB, Brito LF, Queiroz ÉC, Barbosa EN, Teixeira MM, Da Silva LO, Silva LSC, Nascimento FS, Da Silva TL, Martens AA, Siqueira AFP, D'Avila Assumpção MEO, Machado-Santelli GM, Bastos BL, Guimarães AMS, Timenetsky J, Marques LM. *Ureaplasma diversum*

and Its Membrane-Associated Lipoproteins Activate Inflammatory Genes Through the NF- $\kappa$ B Pathway via Toll-Like Receptor 4. **Front. Microbiol.** 9:1538. 2018.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterialexopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. **Front. Microbiol.**6:496.2015.

SHARMA, S.; PANDEY, M.; ONTERU, S.K.; SINGH, D. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Ureaplasma diversum* from Cervico-vaginal Swab of Buffaloes. **Appl Biochem Biotechnol.** Apr;190(4):1201-1211. 2020.

SHELDON, I. M. et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, v. 148, n. 3, p. R41-51, 2014.

SHELDON, I. M. Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 27, n. 1, p. 72-81, 2014.

SHIMIZU, T.; KIDA, Y.; KUWANO, K. *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF- $\kappa$ B through TLR1, TLR2 and TLR6. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 5, p. 1318-25, May 2008. ISSN 1350-0872. 2008.

SILVA JK, MARQUES LM, TIMENETSKY J, DE FARIAS ST. *Ureaplasma diversum* protein interaction networks: evidence of horizontal gene transfer and evolution of reduced genomes among *Mollicutes*. **Can J Microbiol.** Aug;65(8):596-612. 2019.

SILVA, J. R. et al. Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF- $\alpha$  mediated womb inflammation in mice. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 88, p. 643-52, 2016.

SILWEDEL C, FEHRHOLZ M, SPEER CP, RUF KC, MANIG S, GLASER K. Differential modulation of pulmonary caspases: Is this the key to *Ureaplasma*-driven chronic inflammation? **PLoS ONE** 14(5): e0216569. 2019.

SINGH SM, PANDA AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of bioscience and bioengineering.** 2005;99(4):303-10. 2005.

SIRAND-PUGNET, P. et al. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. **PLoS Genet**, v. 3, n. 5, p. e75,. ISSN 1553-7404. 2007.

SMITH, P.F. Detection of Lipoglycans in *Ureaplasmas*. **Journal Of Bacteriology**, p. 611-614. 1985.

SORENSEN HP, MORTENSEN KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology.**115(2):113-28. 2005.

STERNER-KOCK, A. et al. Morphological characterization and immunohistochemical detection of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-17A, and TNF- $\alpha$  in lung lesions associated with contagious bovine pleuropneumonia. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 48, n. 3, p. 569-76, 2016.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 85-94, 2000.

SUN L, MIDDLETON DR, WANTUCH PL, OZDILEK A, AVCI FY. Carbohydrates as T-cell antigens with implications in health and disease. **Glycobiology**. Oct;26(10):1029-1040. 2016.

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

TAMURA, K., et al., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, **24**(8): p. 1596-9. 2007.

TAMURA, K., G. STECHER, AND S. KUMAR, MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Mol Biol Evol**, **38**(7): p. 3022-3027. 2021.

TESFAYE, D., et al., The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. **Reprod Domest Anim**, **41**(6): p. 501-9. 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TOTTÉ, P. et al. Free exopolysaccharide from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* possesses anti-inflammatory properties. **Vet Res**, v. 46, p. 122, Oct 2015. ISSN 1297-9716.

TSIKAS, D., Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, **851**(1-2): p. 51-70. 2007.

TSIRIGOS, K. D.; PETERS, C.; SHU, N.; KÄLL, L.; ELOFSSON, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W401–W407, 1 jul. 2015.

UCHIDA, K. et al. Effects of *Ureaplasma parvum* lipoprotein multiple-banded antigen on pregnancy outcome in mice. **J. Reprod. Immunol.**, v. 100, n. 2, p. 118-27, 2013.

United States Department Of Agriculture (USDA). Livestock and Products Semi-annual. **GAIN**. BR2021-0007. 2021.

VALIENTE E, BOUCHÉ L, HITCHEN P, FAULDS-PAIN A, SONGANE M, DAWSON LF, DONAHUE E, STABLER RA, PANICO M, MORRIS HR, BAJAJ-ELLIOTT M, LOGAN SM, DELL A, WREN BW. Role of Glycosyltransferases Modifying Type B Flagellin of Emerging Hypervirulent *Clostridium difficile* Lineages and Their Impact on Motility and Biofilm Formation. **J Biol Chem**. Dec 2;291(49):25450-25461. 2016.



WAITE, E.R.; MARCH, J.B. Capsular Polysaccharide Conjugate Vaccines against Contagious Bovine Pleuropneumonia: Immune Responses and Protection in Mice. **J. Comp. Path.**, Vol. 126, 171–182. 2002.

WANG, Y. et al. *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 $\beta$  production through the NF- $\kappa$ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 55, p. 111-8, 2016.

WANG, Y., HUANG, JM., ZHOU, YL. et al. Phylogenomics of expanding uncultured environmental Tenericutes provides insights into their pathogenicity and evolutionary relationship with Bacilli. **BMC Genomics** **21**, 408. 2020.

WESTBERG J, PERSSON A, HOLMBERG A, GOESMANN A, LUNDEBERG J, JOHANSSON KE, PETTERSSON B, UHLÉN M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). **Genome Res.** Feb;14(2):221-7. 2004.

WEYANT KB, MILLS DC, DELISA MP. Engineering a new generation of carbohydrate-based vaccines. **Curr Opin Chem Eng.** 2018

XIA P, WU Y, LIAN S, YAN L, MENG X, DUAN Q, ZHU G. Research progress on Toll-like receptor signal transduction and its roles in antimicrobial immune responses. **Appl Microbiol Biotechnol.** Jul;105(13):5341-5355. 2021.

XUE Q, YAN Y, ZHANG R, XIONG H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **Int J Mol Sci.** 2018 Nov 29;19(12):3805. 2018.

YAKOVLIEVA, L.; WALVOORT, M.T.C. Processivity in Bacterial Glycosyltransferases. **ACS Chemical Biology.** 15 (1), 3-16. 2020.

YIWEN, C.; YUEYUE, W.; LIANMEI, Q.; CUIMING, Z.; XIAOXING, Y. Infection strategies of mycoplasmas: Unraveling the panoply of virulence factors. **Virulence.** Dec;12(1):788-817. 2021.

YOGEV D., BROWNING G.F., Wise K.S. Genetic Mechanisms of Surface Variation. In: Razin S., Herrmann R. (eds) *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Springer, Boston, MA. 2002.

YOU, X. X.; ZENG, Y. H.; WU, Y. M. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 7, n. 5, p. 342-50, 2006.

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

ZBINDEN, C. et al. The immune response of bovine mammary epithelial cells to live or heat-inactivated *Mycoplasma bovis*. **Vet. Microbiol.**, v. 179, n. 3-4, p. 336-40, 2015.

ZHU, F.; ZHANG, H.; WU, H. Glycosyltransferase-mediated Sweet Modification in Oral Streptococci. **Journal of Dental Research**, Vol. 94(5) 659–665. 2015.

ZIMMERMAN, C. U.; ROSENGARTEN, R.; SPERGSEER, J. Ureaplasma antigenic variation beyond MBA phase variation: DNA inversions generating chimeric structures and switching in expression of the MBA N-terminal paralogue UU172. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 663-76, Feb 2011. ISSN 1365-2958. 2011.

ZUO, L. L.; WU, Y. M.; YOU, X. X. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 10, n. 1, p. 67-76, 2009.

**Anexo A – Certificado do curso de Biossegurança**



Certificamos que  
**IZADORA DE SOUZA REZENDE**  
participou do treinamento de  
***Biossegurança em Laboratórios de Pesquisa***  
realizado no Departamento de Microbiologia – ICB/USP,  
no dia 28 de maio de 2013, com carga horária total de 8 horas.

Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado  
Coordenador do Curso de Biossegurança

Dra. Veridiana Munford  
Responsável pelo treinamento

## Anexo B – Certificado do curso de Uso de Animais em Experimentação



Uso de animais  
para experimentação



### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

**Izadora de Souza Rezende**

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, 23 de setembro de 2021  
Comissão de Biotérios  
ICB USP

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



Declaro, para os devidos fins, que

**izadora de Souza Rezende**

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

São Paulo, 16 agosto 2018  
(Declaração válida por 5 anos)

**Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva**  
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

**Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira**  
Diretor do ICB