

**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

## 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.

## 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**

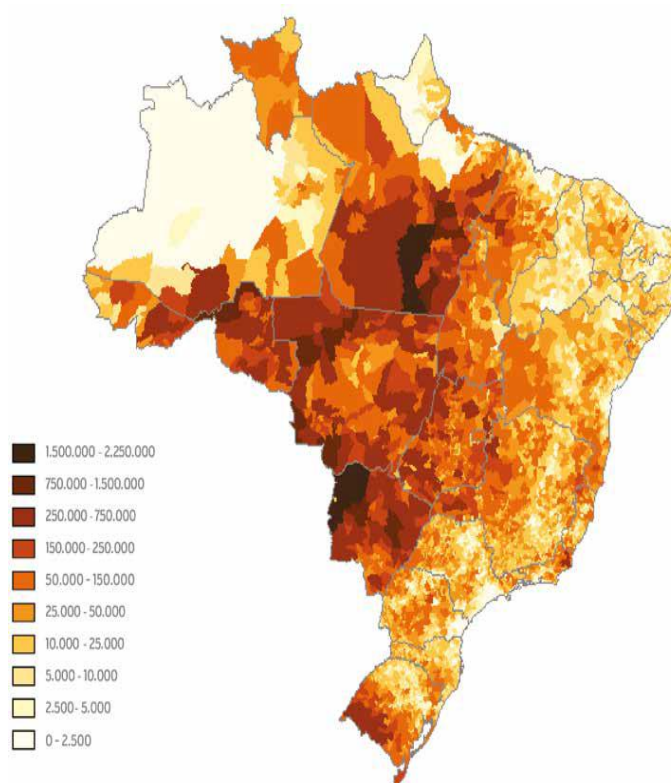
### **2.1 Bovinocultura**

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)

<b>Estado</b>	<b>Rebanho estimado (cabeças)</b>
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 mollicutes 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; DYBVIG 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*.

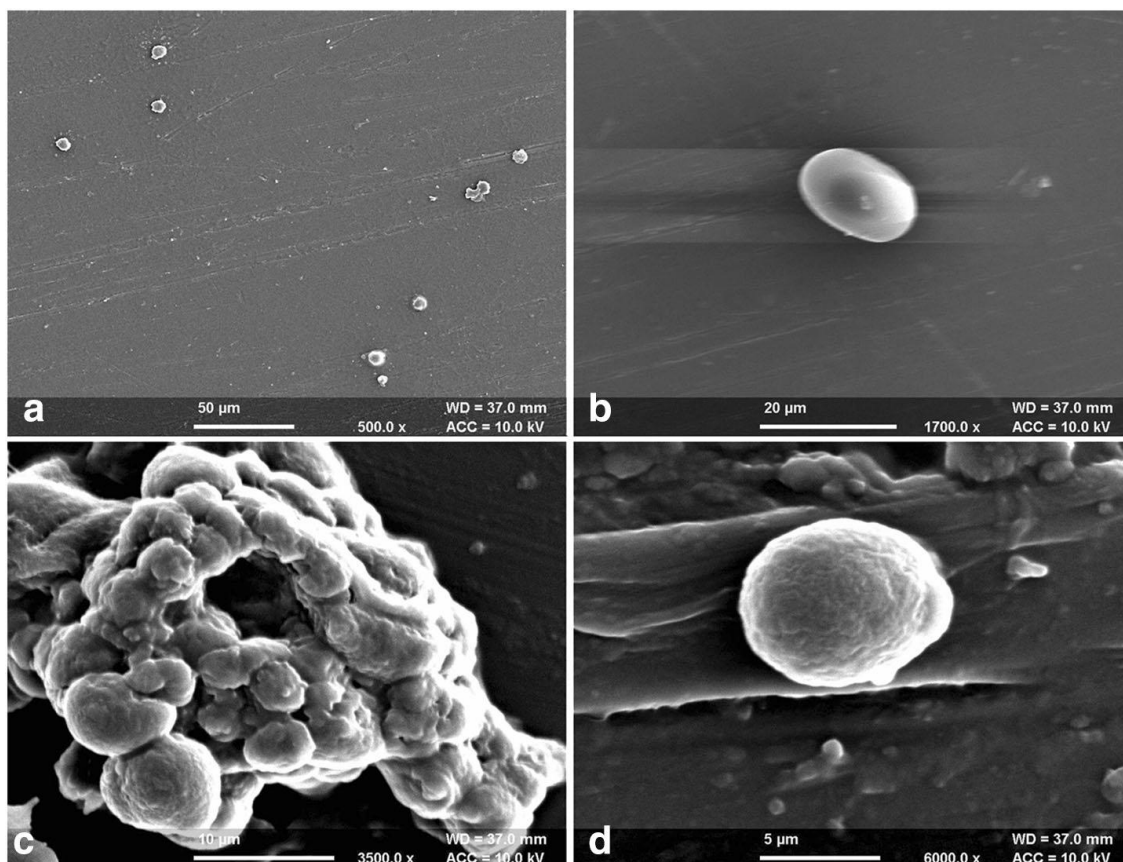
Considera-se *M. bovis genitalium* como o agente primário da vulvovaginite (DOIG et al., 1979) mas também causador de infertilidade, endometrite necrotizante, vesiculite seminal e diminuição da motilidade espermática (NICHOLAS et al., 2006; RUHNKE e ROSENDAL, 1994). As infecções genitais causadas pelo 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, METTIFOGO 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-κB 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 saudáveis. 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).

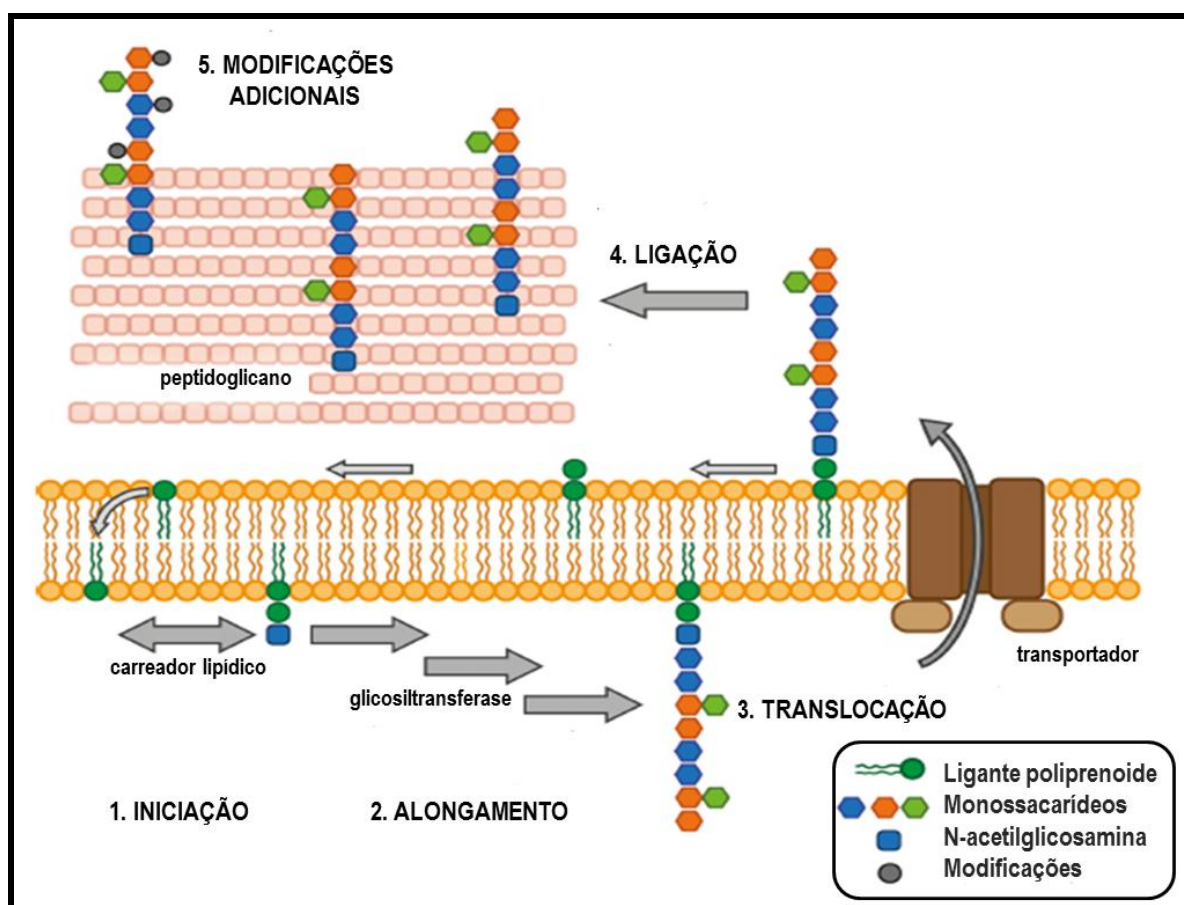
#### 2.4.2.1 Cápsula polissacarídica e glicosiltransferase

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 flancoadoras 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).

## 2 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 bovigenitalium* 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 spermatozooids. **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, TERAO 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.

LEMOS 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.