



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Beatriz Almeida Sampaio

Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos para seleção de candidatos vacinais

Vitória da Conquista

2021

BEATRIZ ALMEIDA SAMPAIO

Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos para seleção de candidatos vacinais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Lopes Bastos
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2021

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

A447

Sampaio, Beatriz Almeida.

Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos para seleção de candidatos vacinais. / Beatriz Almeida Sampaio. – 2021

53 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Lopes Bastos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2021.

1. *Mycoplasma agalactiae*. 2. Agalaxia contagiosa. 3. Vacina. I. Universidade Federal da Bahia. II. Marques, Lucas Miranda. III. Bastos, Bruno Lopes. IV. Título.

CDU: 636.39

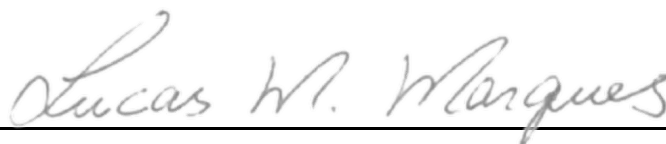
Elaborado por Marcos Aurélio Ribeiro da Silva CRB5/1858

BEATRIZ ALMEIDA SAMPAIO

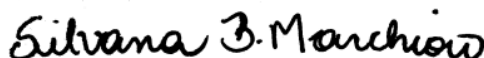
**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Mycoplasma agalactiae* EM CAPRINOS PARA
SELEÇÃO DE CANDIDATOS VACINAIS**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 22/10/2021.



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Orientador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof^a. Dr^a. Silvana Beutinger Marchioro (Examinadora)
(Universidade Federal da Bahia)



_Prof. Dr. Ricardo Evangelista Fraga (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)

Dedico esse trabalho aos meus pais (Juscely e Fabiana) e ao meu irmão (Bernardo) por todo incentivo, amor e paciência. Aos meus familiares, amigos e colegas por toda compreensão, apoio e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela minha vida, por me abençoar e me conceder força durante essa trajetória. Agradeço a Ele pela vida de todas as pessoas incríveis que me cercam. Aos meus pais (Juscely e Fabiana) e ao meu irmão (Bernardo) pela paciência, carinho, amor, incentivo e esforço. Meu amor por vocês é incondicional. À minha família, avós, tios (as) e primos (as) por todo apoio e paciência.

Agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Marques, pela confiança para realização deste trabalho, por toda compreensão, paciência, motivação e excepcional orientação desde a graduação. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Bruno Bastos, por todo entusiasmo, motivação e aprendizado. À ambos, muito obrigada por serem pessoas incríveis.

A todos os meus amigos que são uma rede de apoio e confiança. À Júlian, Nayara e Thaís pela compreensão nos momentos de ausência, incentivo e por estarem aqui independente de tudo. À Taiana, por sempre ter o conselho, por me guiar e por ser luz independente da distância. À Ágatha, pelo companheirismo, apoio, compreensão, colo, carinho e cuidado. Obrigada por terem segurado a minha mão inúmeras vezes, tornar o caminho mais leve e acreditado tanto em mim!

Aos professores da UFBA – IMS/CAT por todo conhecimento compartilhado. Aos técnicos, em especial a Janeide, por toda ajuda. A equipe estrutural do instituto, em especial o pessoal da limpeza e recepção, por todo carinho.

Ao Prof. Dr. Jurandir Cruz da UESB pela parceria e contribuição para realização deste trabalho.

Ao Projeto Micro, muito obrigado por todo apoio, ajuda e carinho. Aos meus amigos e colegas de laboratório, principalmente à Bruna, Maysa, Lucas Santana, Manoel, Camila Pacheco, Valdiele, Thiago, Hellen e Nathan por todo conhecimento compartilhado, as risadas, brincadeiras, paciência e por tornarem o trabalho no laboratório mais alegre. Ao meu amigo desde a graduação, Rafael, por ouvir todas as minhas reclamações e choros nos corredores da UFBA, pela paciência e conforto.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

A todos que caminharam junto comigo e torceram por mim, todo o meu carinho e amor. Obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

SAMPAIO, B. A. **Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos para seleção de candidatos vacinais.** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2021.

A agalaxia contagiosa é uma doença causada classicamente pelo *Mycoplasma agalactiae* e afeta pequenos ruminantes no mundo todo, sendo considerada endêmica em alguns países. Caracterizada por ocasionar mastite, agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite, a doença resulta em grandes perdas econômicas para pequenos e grandes produtores. Como alternativa as medidas imunoprolifáticas existentes, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante contra *M. agalactiae* sendo avaliada quanto a sua resposta imune específica em caprinos. Foram utilizadas 12 cabras, divididas em três grupos (controle, recombinante e bacterina). Os animais do grupo recombinante foram imunizados com uma solução de proteínas recombinantes, sendo essas, duas lipoproteínas de *M. agalactiae* (P40 e MAG_1560), enquanto o grupo bacterina foi imunizado com *M. agalactiae* inativado (10^9 CFU/ml). Ambas soluções foram emulsionadas em adjuvante de Freund's. Os animais foram avaliados pelo período de 181 dias quanto a produção de anticorpos IgG e resposta *in vitro* de PBMC's ao estímulo das proteínas recombinantes com análise posterior da expressão de IL-1 β , IFN- γ , IL-12 e MHC-II. Foi observado no soro dos animais imunizados com proteínas recombinantes a produção específica de anticorpos contra extrato total e proteínas de membrana de *M. agalactiae*. Os animais imunizados com bacterina também foram capazes de produzir anticorpos específicos principalmente contra a proteína MAG_1560. A avaliação do desenvolvimento da resposta imune através da expressão gênica de citocinas apresentou aumento de mRNA da citocina pró-inflamatória IL-1 β ao longo do tempo em resposta ao estímulo das proteínas P40 e MAG_1560 pelo grupo recombinante e bacterina. No grupo bacterina foi observada redução dos níveis de mRNA de IFN- γ , enquanto no grupo recombinante em resposta ao estímulo da P40 ocorreu aumento da expressão, mas nenhuma ou redução da expressão com a MAG_1560 foi observada. No grupo recombinante, a expressão citocina IL-12 em 168 dias teve aumento da expressão com o estímulo da P40 quando comparado a células não estimuladas e a MAG_1560 apresentou aumento da expressão com 56

dias. O grupo bacterina ao longo do tempo teve aumento na expressão gênica de IL-12. As proteínas foram capazes de estimular a expressão gênica MHC-II em ambos os grupos. O modelo vacinal de subunidade aqui apresentado possui dados promissores de uma vacina capaz de induzir resposta celular e humoral. A produção de novas vacinas a partir de proteínas antigênicas recombinantes irá possibilitar uma alternativa as vacinas existentes (inativadas e atenuadas), de forma segura e eficaz, para a prevenção da agalaxia contagiosa contribuindo para a saúde animal com impacto econômico no aumento da produtividade caprina.

Palavras-chave: Agalaxia contagiosa; *M. agalactiae*; recombinante; subunidade; vacina.

ABSTRACT

SAMPAIO, B. A. **Evaluation of the immunogenicity of recombinant proteins from *Mycoplasma agalactiae* in goats for selection of vaccine candidates.** Dissertation (Masters in Biosciences) – Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2021.

The contagious agalactia is a disease classically caused by *Mycoplasma agalactiae* affecting small ruminants worldwide being considered endemic in some countries. Characterized by causing mastitis, agalactia, arthritis and keratoconjunctivitis, the disease results in huge losses to small and large producers. Characterized by causing mastitis, agalactia, arthritis and keratoconjunctivitis, the disease results in great economic losses for small and large producers. As an alternative to the existing immunoprophylactic measures, the present study aimed to develop a recombinant subunit vaccine against *M. agalactiae* being evaluated for its specific immune response in goats. Twelve goats were used, divided into three groups (control, recombinant and bacterin). The animals in the recombinant group were immunized with a solution of recombinant proteins, these being two lipoproteins from *M. agalactiae* (P40 and MAG_1560), while the bacterin group was immunized with inactivated *M. agalactiae* (10^9 CFU/ml). Both solutions were emulsified in Freund's adjuvant. The animals were evaluated for a period of 181 days for the production of IgG antibodies and *in vitro* response of PBMC's to the stimulus of recombinant proteins with subsequent analysis of the expression of IL-1 β , IFN- γ , IL-12 and MHC-II. The specific production of antibodies against total extract and membrane proteins of *M. agalactiae* was observed in the serum of animals immunized with recombinant proteins. Animals immunized with bacterin were also able to produce specific antibodies mainly against the MAG_1560 protein. The evaluation of the development of the immune response through the gene expression of cytokines showed an increase in mRNA of the proinflammatory cytokine IL-1 β over time in response to the stimulation of P40 and MAG_1560 proteins by the recombinant and bacterin groups. In the bacterin group, a reduction in IFN- γ mRNA levels was observed, while in the recombinant group, in response to the P40 stimulus, there was an increase in expression, but none or a reduction in expression with MAG_1560 was observed. In the recombinant group, IL-12 cytokine expression in 168 days has increased expression with the stimulation of P40 when compared to non-stimulated cells and MAG_1560 showed increased expression with 56 days. Over time, the bacterin group had

an increase in IL-12 gene expression. The proteins were able to stimulate MHC-II gene expression in both groups. The subunit vaccine model presented here has promising data for a vaccine capable of inducing cellular and humoral responses. The production of new vaccines from recombinant antigenic proteins will enable an alternative to existing vaccines (inactivated and attenuated), in a safe and effective way, for the prevention of contagious agalactia, contributing to animal health with an economic impact on increasing goat productivity.

Keywords: Contagious agalactia; *M. agalactiae*; recombinant; subunit; vaccine.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
µL:	Microlitro
AC:	Agalaxia contagiosa
BCA:	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Ácido bicinconínico)
C:	Citosina
CFU:	<i>Colony forming unit</i> (Unidade formadora de colônias)
CPP:	Pleuropneumonia contagiosa caprina
DNAc:	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTP:	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
G:	Guanina
H₂SO₄:	Ácido Sulfúrico
IFNγ:	Interféron gama
IL-12:	Interleucina 12
IL-1β:	Interleucina 1 beta
LB:	Luria Bertani
LPS:	Lipopolissacarídeo
mg:	Miligrama
MHC-II:	<i>Major histocompatibility complex class II</i> (Moléculas de complex de histocompatibilidade de classe II)
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
Mpb:	Mega pares de bases
mRNA:	Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88:	Fator de diferenciação mieloide 88
nm:	Nanômetros
OIE:	World Organization for Animal Health (Organização Mundial da Saúde Animal)

OPD:	O-fenilenodiamina dicloridrato
PAA:	Programa de Aquisição de Alimentos
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salina)
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH:	Potencial hidrogeniônico
PMSF:	<i>Phenylmethane sulfonyl fluoride</i> (Fluoreto de fenil-metil-sufonila)
qPCR:	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
rpm:	Rotação por minuto
rRNA:	Ácido ribonucleico ribossomal
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Sulfato dodecil de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida)
Th1:	T auxiliar tipo 1
Th2:	T auxiliar tipo 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteínas recombinantes purificadas visualizadas em Western Blot.....	61
Figura 2 - ELISA indireto do soro de animais inoculados (controle, proteínas recombinantes e bacterina).	62
Figura 3 - Expressão gênica de IL-1 β de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560.	16
Figura 4 - Expressão gênica de IFN- γ de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560..	18
Figura 5 - Expressão gênica de IL-12 de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560..	19
Figura 6 - Expressão gênica de MHC-II de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560..	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Caprinos e produção de leite.....	17
2.2 <i>Mollicutes</i>	18
2.3 Agalaxia contagiosa.....	19
2.4 <i>Mycoplasma agalactiae</i>	26
2.5 Vacinas recombinantes	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivo específico	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. Proteínas recombinantes	30
4.1.1. Expressão e purificação de proteínas antigênicas.....	30
4.1.2. Quantificação de proteínas	31
4.2. Cultivo e inativação de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	31
4.3. Extração de proteína de membrana.....	31
4.4. Imunização dos animais.....	32
4.4.1. Formulação do imunizante experimental	32
4.4.2. Animais e grupos experimentais.....	32
4.5. Coletas de amostras sanguíneas	33
4.6. Determinação dos níveis de produção de IgG específica para as proteínas produzidas	33
4.7. Análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios desencadeada pela estimulação <i>in vitro</i> de células sanguíneas do sangue periférico (PBMC).....	33
4.7.1. Isolamento de PBMC	34
4.7.2. Estimulação das células com as proteínas recombinantes e <i>Mycoplasma agalactiae</i>	34
4.7.3. Extração de RNA.....	35
4.7.4. Conversão em DNAc.....	35
4.7.5. Expressão gênica	36
4.8. Análise Estatística.....	36
5. REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 1.....	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

1. INTRODUÇÃO

Mollicutes são as menores células bacterianas capazes de se autorreplicar e de vida livre. São pleomórficos, uma vez que há ausência da parede celular e tipicamente suas colônias possuem a formato de “ovo frito” (RAZIN, 1992; RIVERA-TAPIA; CEDILLO-RAMÍREZ; JUÁREZ, 2002). Pertencente a classe *Mollicutes*, a espécie *Mycoplasma* constitui o maior número de espécies conhecidas dentro da classe. A explicação para muitas das propriedades únicas dos micoplasmas como a sensibilidade ao choque osmótico a detergentes, a resistência a penicilina e a morfologia de suas colônias podem ser obtidas a partir da total ausência da parede celular (RAZIN, 2006; RAZIN; OLIVER, 1961).

M. agalactiae (*Ma*) é, classicamente, o agente etiológico da agalaxia contagiosa (AC), uma grave micoplasmose que afeta caprinos e ovinos no mundo todo. A primo-infecção por *Ma* ocasiona grandes perdas econômicas, particularmente a laticínios de grande porte, por causar mastite e agalaxia aguda, sendo frequentemente associada a ceratite e artrite (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997). As perdas devido a doença podem ser em decorrência à morte de animais, produção de leite, custos de tratamento e prevenção (DE AZEVEDO et al., 2006). Há uma resposta eficaz quanto ao uso sistêmico de antibióticos como tratamento, entretanto, a aplicação local em regiões anatômicas afetadas deve acompanhar o tratamento sistêmico (KUMAR et al., 2014). Por outro lado, as estratégias de vacinação para agalaxia contagiosa dependem de vacinas inativadas ou atenuadas. A eficácia das vacinas inativadas levanta questionamentos, enquanto as vacinas atenuadas geram preocupações quanto a segurança, eficácia, inocuidade e não são permitidas em muitos países (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; DE LA FE et al., 2007a). Antibioticoterapia e vacinação são alternativas ao abate de animais de alto valor genético que se encontram infectados (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013a).

Relacionado a patogenicidade dos micoplasmas, as proteínas de membrana desempenham um papel fundamental (SANTONA et al., 2002). Estudos que trazem a identificação e caracterização dessas proteínas, principalmente quanto ao seu imunoproteoma, possibilitam o conhecimento de alvos para a formulação de novas vacinas contra *Ma*. Proteínas antigênicas e imunorreativas aos soros de caprinos naturalmente infectados, como a P40, MAG_1560 e MAG_6130 foram identificadas dentre 156 proteínas de membrana de *Ma* e apresentadas como potenciais candidatas a formulação de vacina contra AC (BARBOSA et al., 2020; FLEURY et al., 2002). O isolamento de estruturas bacterianas, como proteínas

antigênicas ou polissacarídeos, são subunidades que purificadas são utilizadas para compor vacinas de subunidades (STRUGNELL et al., 2011). Esse modelo de vacina possui propriedades atraentes como maior eficiência da vacinação e capacidade de combinar antígenos com outros imunizantes (NKANDO et al., 2016).

Nesse contexto, apesar de serem escassos os estudos com a utilização de vacinas recombinantes de subunidades aplicadas a *Ma*, o estudo de proteínas antigênicas e a sua utilização para desenvolvimento de vacinas recombinantes utilizando subunidades do microrganismo são um caminho promissor considerando questionamentos relacionados a eficácia e segurança das vacinas existentes para agalaxia contagiosa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caprinos e produção de leite

Em pequenos sistemas agrícolas e na agricultura, os pequenos ruminantes são importantes na formação de um nicho econômico e ecológico. Caprinos estão dentre as primeiras espécies a serem domesticadas e têm o seu leite e carne sendo usufruídos, no Oriente Médio, desde 2500 a.C (DUBEUF; BOYAZOGLU, 2009; ESCAREÑO et al., 2012). A criação de cabras contribui para a subsistência das famílias de fazendeiros criadores de gado, de média e baixa renda, que além de suas pequenas propriedades e rebanho possuem poucos recursos. Esses animais podem fornecer suprimento farto e regular de leite, fibras, pele e carne (DHARA et al., 2012). Além disso, exigem pouco na alimentação, uma vez que podem utilizar vegetação rasteira e arbustos que não são tão bem aceitas por outros animais como ovinos e bovinos (MORAND-FEHR et al., 2004).

Desde 1960, a população caprina global tem aumentado devido às mudanças nas preferências alimentares da população, na fonte renda e mudanças climáticas que limitam a criação de gado em determinadas áreas (MILLER; LU, 2019). Em 2019, a produção global do rebanho caprino contava com mais de 1 bilhão de cabeças. A participação dos continentes na produção do animal é liderada pela Ásia (52,6%), seguido de África (41,9%), Américas (3,6%), Europa (1,5%) e Oceania (0,4%). Os dez maiores países produtores são compostos majoritariamente por países asiáticos e africanos, sendo os três maiores produtores a Índia, China e Nigéria. Por outro lado, quanto a produção de leite caprino, a Europa (15,4%) possui maior produção que as Américas (4%). A Índia, além de ter o maior número de caprinos, segue como a maior produtora de leite, seguida por Bangladesh, Sudão, Paquistão, França, Turquia, Espanha, Sudão do Sul, Níger e Países Baixos (FAO, 2019).

Nas Américas, o México e Brasil, com pequena produção e aproveitamento local, são os principais produtores de leite caprino. Apesar de menor quantidade, os Estados Unidos e o Canadá têm crescido com o rebanho de cabras leiteiras. O Brasil é considerado o maior produtor de leite de cabra na América do Sul (LU; MILLER, 2019). Em 2017, o território brasileiro, produziu 26,1 milhões de litros de leite caprino. O país, em 2019, contava com 11,3 milhões de caprinos, sendo o Nordeste o maior detentor, com mais de 10,6 milhões de cabeças (IBGE, 2017, 2019). Na região Nordeste, com o objetivo de fortalecer agricultores familiares e simultaneamente alimentar parte da população em risco alimentar, através do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), há o incentivo à produção por parte do governo federal e

estadual que realiza a compra de leite caprino desses produtores. Em regiões, como no Sudeste o incentivo de produção provém da busca de alimentos diferenciados de um mercado consumidor especial (PERDIGÃO; OLIVEIRA; CORDEIRO, 2016).

Fatores limitantes que podem interferir no aumento da produtividade e da oferta de leite ou carne caprina no Brasil incluem: nutrição, alimentação do rebanho, intervalo entre os partos, potencial genético e controle de enfermidades. É necessário que esses fatores estejam incluídos nos custos da produção de leite (LUIGI GONÇALVES et al., 2008). Ainda assim, a caprinocultura leiteira no país se consolida com rentabilidade por não necessitar de grandes áreas para o desenvolvimento ou de muitos investimentos (VASCONCELOS et al., 2008).

2.2 *Mollicutes*

Os microrganismos da classe *Mollicutes*, pertencente ao filo *Tenericutes*, são caracterizados por não sintetizarem precursores do peptidoglicano sendo bactérias desprovidas de parede celular. Circundados apenas por uma membrana plasmática, os procariotos da classe são pleomórficos e quase todas as espécies, em condições adequadas, formam colônias em formato de ovo-frito (BERGEY, 2010). São definidos pelo pequeno tamanho do genoma variando entre 0.58-2.2 Mpb, contendo baixo conteúdo de G+C compreendendo entre ~23-40% mol (RAZIN; HERRMANN, 2002).

Há uma lista crescente de hospedeiros para esses microrganismos em decorrência a sua ampla distribuição na natureza, infectando plantas, animais, humanos, aves, peixes e insetos (RIVERA-TAPIA; CEDILLO-RAMÍREZ; JUÁREZ, 2002). A classe *Mollicutes* é subdividida em quatro ordens: *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* e *Anaeroplasmatales*. A ordem *Mycoplasmatales* composta por duas famílias, *Mycoplasmataceae* e *Incertae sedis*, compreende majoritariamente as espécies pertencentes a classe *Mollicutes*. A família *Mycoplasmataceae* possui dois gêneros, *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, possuindo o gênero *Mycoplasma* 116 espécies validamente descritas (BERGEY, 2010).

A ausência da parede celular separa os micoplasmas de outras bactérias colocando-os na classe *Mollicutes*. Delimitados apenas por uma membrana plasmática as células de micoplasma são predominantemente esféricas com diâmetro variando entre 0,3 - 0,8 μm (RAZIN, 2006). Com a ausência da parede celular em *Mollicutes*, há resistência inata desses microrganismos a β -lactâmicos e todos os antimicrobianos que tem como alvo a parede celular, como fosfomicina e glicopeptídeos. São também resistentes a sulfonamidas, polimixinas, ácido

nalidíxico, trimetropima e rifampicina (RAZIN; HERRMANN, 2002).

Com o tamanho do genoma reduzido, apresentando uma economia genética biológica, há requisitos nutricionais complexos impostos a esses microrganismos, como a dependência de suprimentos externos de precursores biossintéticos, incluindo nucleotídeos, ácidos graxos, esteróis e aminoácidos. Esses fatores acabam ditando o modo de vida parasitário que poucos organismos possuem (BASEMAN; TULLY, 1997). A adesão dos micoplasmas ao tecido, principalmente ao epitélio, é um mecanismo para sobreviver no hospedeiro para evitar o sistema de defesa e ter acesso aos nutrientes necessários (HENTSCHEL; MÜHLRADT, 1998). Os tratos respiratório e urogenital, glândulas mamárias, olhos e articulações são os habitats naturais dos micoplasmas. Alguns microrganismos desse gênero podem entrar no corpo do hospedeiro pelo trato respiratório ou urogenital e, em seguida, atingir outros tecidos (RIVERA-TAPIA; CEDILLO-RAMÍREZ; JUÁREZ, 2002).

As propriedades patogênicas dos micoplasmas têm contribuição da capacidade de imunomodular a resposta imune do hospedeiro, permitindo o escape e supressão dos mecanismos de defesa estabelecendo uma infecção crônica persistente. Os microrganismos afetam o sistema imunológico induzindo estimulação ou supressão policlonal de linfócitos T e B; aumentando a expressão de receptores celulares; induzindo a produção de citocinas; aumentando a citotoxicidade de células “natural killer” e células T; e com ativação da cascata do sistema complemento (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Para colonização do parasita e para a infecção, a adesão do micoplasma a célula hospedeira é um pré-requisito. Através da mutação a perda da capacidade de adesão resulta em perda de infecciosidade (KRAUSE; LEITH; BASEMAN, 1983; RAZIN; JACOBS, 1992).

Alguns micoplasmas encontrados em humanos podem causar doenças, entretanto outros são comensais, compondo o trato urogenital e microbiota orofaríngea. Animais como ovelhas, cabras, cavalos, galinhas, gado, perus e suínos possuem uma grande variedade de mollicutes, muitos deles patogênicos (RAZIN, 2006).

2.3 Agalaxia contagiosa

Agalaxia contagiosa (AC) e pleuropneumonia contagiosa caprina (CPP) são as principais doenças ocasionadas por micoplasmas em pequenos ruminantes. A agalaxia contagiosa tem como agente clássico *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*), sendo também ocasionada por outros micoplasmas que produzem quadros clínicos semelhantes, como *Mycoplasma capricolum* subespécie *capricolum* (*Mcc*) e *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* “large

colony type” (*MmmLC*). Além de *Mycoplasma putrefaciens* (*Mp*) que em determinadas condições podem ser responsáveis por sintomas similares (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997). A doença, conhecida há 200 anos, foi descrita pela primeira vez em 1816 na Itália, sendo conhecida como “*mal di sito*” (“doença do lugar”) devido a possibilidade dos animais se contaminarem depois de pastarem em local contaminado. A denominação atual foi dada por Brusasco em 1871 (LAMBERT, 1987; NICHOLAS, 1998). A agalaxia contagiosa é listada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como uma das doenças notificáveis (OIE, 2021).

Atingindo caprinos e ovinos de ambos os sexos, dependendo da rota de entrada, quantidade e virulência de organismos e estado imunológico do animal, o período de incubação de *M. agalactiae* pode variar de alguns dias a semanas e até dois meses (KUMAR et al., 2014). Os meios mais comuns de entrada para *Ma* são as vias respiratórias, orais ou mamárias. O agente responsável pela infecção é carregado através do sangue circulante produzindo alterações inflamatórias nos órgãos alvo, como: nódulos linfáticos, olhos, articulações, glândula mamária e tendões. Assim, os animais infectados desenvolvem bacteremia com febre (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Nas micoplasmoses, persistência no hospedeiro e eficiência na colonização são etapas fundamentais durante a infecção e são, principalmente, intermediadas por adesão às células hospedeiras, eliminação de nutrientes e evasão imunológica (JAŤ; TARDY, 2019). Durante a infecção os animais não desenvolvem anemia ou septicemia, apesar de serem afetados clinicamente e metabolicamente, como com a redução de proteínas séricas totais, glicose e concentrações de albumina (KIZIL; OZDEMIR, 2006).

Com a infecção por *Ma*, estágios clínicos da doença na glândula mamária manifestam através de distúrbios funcionais que podem variar de hipogalaxia transitória a agalaxia abrupta e total. São sintomas associados com o desenvolvimento de mastite (bilateral ou unilateral), aumento dos lifonodos retromamários, endurecimento do tecido e formação de abscessos (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997). A mastite catarral ou parenquimatosa, além de levar a agalaxia também leva a atrofia dos tecidos conjuntivos nas glândulas mamárias (KUMAR et al., 2014). O microrganismo tem a capacidade de alterar durante o processo de infecção mamária o subconjunto de células inflamatórias. Além de possivelmente comprometer a habilidade de macrófagos e neutrófilos de fagocitar, o que coincide com a incapacidade do sistema imune inato, durante a fase aguda da infecção mamária, de controlar e bloquear a infecção (CASTRO-ALONSO et al., 2010). Assim, a cabra ou ovelha pode apresentar a diminuição ou perda completa na produção de leite que podem assumir tonalidade amarelada

(leucocitose) (CORRALES et al., 2007).

Os sintomas também podem aparecer através da rigidez das articulações a claudicação severa que impossibilita o animal de andar ou ficar em pé. Na forma de artrite ou poliartrite as articulações do tarso, carpo e dos joelhos são as mais afetadas (CORRALES et al., 2007). Atingindo os olhos, a conjuntivite levando a ceratite parenquimatosa com revascularização da córnea são sintomas oculares (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997). Em fêmeas grávidas, principalmente devido à inflamação do útero, disfunções dos órgãos genitais são observadas com abortos ocasionais ou natimortos. Inflamação testicular pode ser produzida em animais machos. (KUMAR et al., 2014).

Os sinais clínicos ao evoluir irão depender da forma clínica, aguda ou crônica, que prevalece e das medidas terapêuticas e higiênicas aplicadas. Assim, a doença tendo como agente o *M. agalactiae*, será clinicamente reconhecida pela ausência de apetite, alteração da consistência e produção do leite em ovinos ou caprinos em lactação como resultado da mastite, temperatura corporal elevada, ceratoconjuntivite, claudicação e fêmeas grávidas que podem abortar (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; CORRALES et al., 2007; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008). A infecção sistêmica permite que micoplasmas responsáveis por causar agalaxia contagiosa estejam presentes em diferentes localizações anatômicas, explicando as diferentes vias de transmissão, sendo comumente propagado pela via mamária (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013a; PRATS-VAN DER HAM et al., 2016). A transmissão vertical pode ocorrer da mãe para o feto durante a gravidez, observada a existência de poliartrite congênita em cabritos nascidos em rebanho com histórico de surto recente da doença (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; FILIOUSSIS et al., 2011).

A persistência de micoplasmas em órgãos infectados com a doença, como úberes, olhos, trato respiratório e outros locais, tornam estas as principais rotas de transmissão direta dentro do rebanho. Podendo ocorrer através da: via oral, com a alimentação com o colostro; mamária, com a alimentação infantil de animais; e respiratória, com a secreção nasal. A utilização de dispositivos de ordenha dos animais tem papel significativo na transmissão indireta (JAÏ; TARDY, 2019). A presença e excreção de *Ma* no sêmen de caprinos assintomáticos, aponta um provável risco de transmissão venérea de AC (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2015; PRATS-VAN DER HAM et al., 2016). A capacidade do microrganismo de manter-se à temperatura ambiente reforça a sua rápida disseminação através do contato de animais saudáveis e infectados. A presença em rebanho de portadores assintomáticos que carregam o agente infeccioso também é de grande preocupação. Além das espécies de animais que não são hospedeiros e que podem

atuar como reservatórios da infecção, como gado e outros pequenos ruminantes selvagens (KUMAR et al., 2014). Em locais onde a produção leiteira e pastoreio de pequenos ruminantes é comum, considera-se que ocorra o desenvolvimento da agalaxia contagiosa, apesar de ser pouco relatada e subdiagnosticada (JAŸ; TARDY, 2019). Entre ruminantes selvagens, a ocorrência de surtos pode ser associada a movimentação de rebanho, alta densidade populacional, o compartilhamento de pastagens e bebedouros com interação entre espécies domésticas e condições climáticas desfavoráveis. A presença de muitos portadores assintomáticos da doença em áreas endêmicas compromete o controle da doença e medidas de erradicação contribuindo para a persistência da infecção (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013a; VERBISCK-BUCKER et al., 2008).

A doença está concentrada em países da Ásia Ocidental e do Mediterrâneo. Há a dificuldade em estimar a proporção total do problema, uma vez que poucos países realizam estudos de prevalência (LORIA et al., 2019). De acordo com relatórios da OIE relacionado a situação da doença, no período de 2016 a 2019 a presença da agalaxia contagiosa foi anualmente registrada em animais domésticos de países como: Albânia, Brasil (a partir de 2017), Chipre, França, Irã, Israel, Itália, Mongólia, Palestina e Portugal. Esporadicamente durante esse período houve registro nos Estados Unidos, durante o segundo semestre de 2017 e no Chile, durante o primeiro semestre de 2019. Na Espanha, durante esse tempo os relatórios foram de infecção ou infestação em zonas limitadas encaminhando para a efetiva presença da doença. O Japão, desde julho de 2019 tem reportes anuais da enfermidade. (OIE, 2019)

Os dados fornecidos pela OIE não diferenciam os agentes etiológicos, assim devem ser apresentados através de estudos (JAŸ; TARDY, 2019). Na França, a AC é considerada endêmica, sendo que para ovelhas, *M. agalactiae* é um problema na região dos Pirinéus Ocidentais. Apesar de nos últimos anos, devido a medidas de controle, a prevalência da infecção pelo patógeno ter reduzido 5% (CHAZEL et al., 2010; JAŸ; TARDY, 2019). Em estudo envolvendo fazendas de doze províncias da Espanha, *Ma* foi a única espécie encontrada frequentemente presente em ovelhas leiteiras, estando amplamente distribuída (ARIZAMIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012). Em Múrcia, área endêmica da Espanha, 66,7% de 66 rebanhos caprinos analisados foram positivos para micoplasmas, sendo 75% infectados somente com *M. agalactiae*, 4,55% por *M. mycoides* subespécie *capri* e 20,45% por ambas as espécies. Esses animais apesar de não apresentarem surtos de agalaxia contagiosa, apresentaram grande número de casos de mastite clínica ocasionados pelos micoplasmas (AMORES et al., 2012).

No Brasil, a primeira ocorrência de AC tendo como agente etiológico *M. agalactiae*, apresentou animais com alta morbidade da doença e foi introduzida em fazendas onde o microrganismo não estava presente. Após a primeira identificação em São Paulo, a doença se espalhou para Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco (DE AZEVEDO et al., 2006). Três anos depois, no estado da Paraíba, a alta prevalência (83,28%) de anticorpos para *M. agalactiae*, em animais que apresentavam sinais clínicos para AC, foi relatada confirmando a possibilidade da disseminação do patógeno com a comercialização intensiva e trânsito livre de animais (CAMPOS et al., 2009). No Rio Grande do Norte, a soroprevalência de 7,8% de *M. agalactiae* foi identificada em caprinos (DAMASCENO et al., 2020). A presença de anticorpos também foi identificada em caprinos do Ceará (PEIXOTO et al., 2018) e a excreção de *Ma* no sêmen e leite de caprinos no estado de Pernambuco (ALVES et al., 2013). No sudoeste da Bahia, o agente etiológico principal também foi detectado em amostras de *swab* nasal de caprinos, apesar de ter sido um baixo percentual (CASTILHO JUNIOR et al., 2021). A produção caprina foi favorecida pela importação de raças exóticas para o melhoramento genético do rebanho nativo, entretanto consequências socioeconômicas como depreciação e perda dos rebanhos podem ocorrer devido a pouca ênfase no controle das doenças infecciosas como a AC (BANDEIRA et al., 2008).

Com base em sinais clínicos, como a ceratoconjuntivite, lesões articulares, perda da produção de leite e mastite, é realizado o diagnóstico primário ou provisório do organismo. Sugestivo de infecção por *M. agalactiae* há a descoloração do leite em cor verde-amarelada, inchaços articulares e claudicação (KUMAR et al., 2014). O isolamento e identificação do agente infeccioso no exame laboratorial permite a confirmação do diagnóstico clínico. A coleta de material para análise pode ser do leite, sangue, urina, exsudatos articulares e esfregaços vaginais, oculares ou nasais. Após a morte do animal, o exame pode ser realizado através de amostras coletadas também de exsudatos articulares, além da glândula mamária, linfonodos regionais e lesões pulmonares (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

Para o isolamento dos micoplasmas, meios de cultura foram desenvolvidos, como: meio Hayflick, Eaton's ou SP4. Extrato de levedura e soro são componentes comumente adicionados, além de acetato de tálio e penicilina que são utilizados para evitar contaminação bacteriana (CORRALES et al., 2007). Com o isolamento dos micoplasmas causadores da doença no animal afetado, a identificação do microrganismo ocorre através de testes bioquímicos, moleculares e sorológicos (NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008). Sendo que nos isolados, o primeiro teste a ser realizado deve ser a sensibilidade à digitonina, separando assim

Mycoplasma de *Acholeplasma*. Porém, as propriedades bioquímicas como a presença de filme e manchas em meio sólido ou a proteólise em meio contendo caseína ou soro coagulado, são cada vez mais variáveis apresentando pouco valor diagnóstico (OIE, 2018; POVEDA, 1998).

Comumente utilizada, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) parece ser uma ferramenta ainda mais sensível e eficaz para identificação de micoplasmas responsáveis pela agalaxia contagiosa, como o *M. agalactiae* (KUMAR et al., 2014). O diagnóstico pode ser realizado com a identificação através de técnicas de PCR com sequência de RNAr 16S (CHÁVEZ GONZÁLEZ et al., 1995), do gene *uvrC* (SUBRAMANIAM et al., 1998) multiplex-PCR (FODDAI et al., 2005; GRECO et al., 2001) e PCR em tempo real (LORUSSO et al., 2007; ORAVCOVÁ et al., 2009). Em termos de especificidade, sensibilidade e tempo, a técnica de PCR oferece vantagens em relação ao cultivo do microrganismo (NICHOLAS, 2002).

Os testes comerciais de ELISAs existentes para identificação da AC são atualmente limitados a sorodiagnóstico de *Ma* (JAÏ; TARDY, 2019). Entretanto, o desempenho desses testes pode ser afetado pela variabilidade dentro das cepas de *M. agalactiae*, pela região geográfica ou espécies hospedeiras (ovelhas ou cabras). Os testes de ELISA a serem realizados, utilizam antígenos totais da cepa do microrganismo ou proteínas de fusão e cópias de proteínas imunogênicas específicas como antígeno alvo (POUMARAT et al., 2012). Outros testes sorológicos também podem ser realizados como fixação de complemento e teste de imunotransferência (OIE, 2018).

O tratamento da agalaxia contagiosa com antibiótico pode proporcionar o desaparecimento dos sinais clínicos ou sua redução drástica. O uso dos antibióticos pode apresentar certas limitações, entretanto, há eficácia quanto sintomas clínicos em animais infectados de forma subaguda e limitando que animais desenvolvam a forma clínica da doença. O tratamento para o desaparecimento ou redução dos sintomas deve ser adequado em termos de princípio ativo, dose e duração (CORRALES et al., 2007). O resultado do tratamento pode ser fraco ou nenhum caso não ocorra definição da dose terapêutica ou o antibiótico não seja administrado por período suficientemente longo (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Macrolídeos, clindamicina, florfenicol, tilosina, tiamulina, fluoroquinolonas, tilmicosina tetraciclina e lincomicina são antibióticos comumente utilizados para tratar a doença (KUMAR et al., 2014; LORIA et al., 2003). Entretanto, é apresentada a resistência de *Ma* a antibióticos como macrolídeos, lincosamidas, tilosina e fluoroquinolonas (PRATS-VAN DER HAM et al., 2017b; TATAY-DUALDE et al., 2017). Além também de causar efeitos na redução da motilidade espermática de caprinos em tratamento com marbofloxacina (fluoroquinolona

sintética) (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013b).

No intuito de minimizar a expressão clínica da doença, estratégias preventivas além do abate e tratamento com antibióticos, incluem a vacinação. Nos países mediterrâneos da Europa e na Ásia Ocidental, as vacinas para prevenção são amplamente utilizadas. Sendo aplicadas extensamente no sul da Europa, há as vacinas comerciais inativadas por formalina aplicadas para *Ma*, entretanto, não são consideradas muito eficazes. Em países como a Turquia, sendo consideradas mais protetoras que as inativadas, são utilizadas vacinas vivas atenuadas para o patógeno. Em contrapartida, as vacinas atenuadas trazem preocupações quanto a inocuidade, eficácia e segurança, não sendo permitidas em diversos países. Esse modelo vacinal não pode ser aplicado em animais lactantes e podem produzir infecção passageira com eliminação de micoplasma (DE LA FE et al., 2007b; OIE, 2018). Como a doença pode ser ocasionada por mais de uma espécie de micoplasma, também há a comercialização de vacinas trivalentes, na Itália, combinando *M. agalactiae*, *MmmLC* e *Mcc* (NICHOLAS; AYLING; MCAULIFFE, 2009). No Brasil, não há legislação quanto ao uso das vacinas para AC, além da indisponibilidade destas no mercado (ALCÂNTARA et al., 2013).

A inativação de *Ma* com saponina, fenol ou formalina é capaz de manter o padrão de proteínas de superfície próxima ao micoplasma intacto. Porém, vacinas inativadas com fenol e saponina garantem maior proteção contra a infecção pelo patógeno do que as inativadas por formalina (TOLA et al., 1999). Quando comparada uma vacina experimental inativada com saponina com vacina comercializada inativada por formalina, a inativada por saponina apresentou maior proteção além de diminuir a excreção de micoplasmas reduzindo assim o risco de disseminação da infecção dentro do rebanho. Entretanto, a vacina viva atenuada apresentou maior eficácia quanto a proteção e redução da excreção quanto as vacinas inativadas comercial e experimental (AGNONE et al., 2013).

A medida vacinal licenciada para prevenção da agalaxia contagiosa faz necessária repetidas vacinações a cada seis meses, uma vez que a indução de níveis de anticorpos que podem rapidamente diminuir. A eficácia de proteção dessas vacinas depende de propriedades como quantidade do antígeno, cepa vacinal ou adjuvantes (LACASTA et al., 2015). As vacinas que são compostas por adjuvantes como hidróxido de alumínio, apesar de promover baixa produção de anticorpos que persistem por curto período, proporcionam maior segurança. Todavia, apesar da possibilidade de provocar no animal, no local de inoculação, indução de reação granulomatosa, vacinas com adjuvantes de óleo mineral são capazes de produzir maiores níveis de anticorpos por longos períodos e são altamente imunogênicas (BUONAVOGLIA et

al., 2010).

A identificação e caracterização de proteínas imunogênicas do agente etiológico, *Ma*, podem ser promissoras na formulação de vacinas recombinantes proteicas para a doença (BARBOSA et al., 2020; CACCIOTTO et al., 2010; CHESSA et al., 2009; FLEURY et al., 2001, 2002). As vacinas de nova geração contra a AC seriam favoráveis em regiões endêmicas com baixo padrão social e econômico em que a vacinação é considerada adequada (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

2.4 *Mycoplasma agalactiae*

Dentre as, aproximadamente, 200 diferentes espécies de mollicutes animais conhecidas, principalmente espécies de *Mycoplasma*, uma pequena parte é patogênica. As micoplasmoses animais, em sua maioria, são doenças com letalidade relativamente baixa e com alta morbidade (RAZIN; HERRMANN, 2002). Dessa forma, há um papel dominante na epidemiologia das micoplasmoses em portadores aparentemente saudáveis. Assim, as micoplasmoses animais são essencialmente problemas de rebanho do ponto de vista econômico e médico (NICOLET, 1996). São responsáveis por doenças graves na pecuária, como agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes, pleuropneumonia contagiosa caprina e bovina, pneumonia enzoótica em suínos, doença respiratória crônica em aves e pneumonia em bezerros (NICHOLAS; AYLING; MCAULIFFE, 2009). Em muitas doenças bovinas e ovinas, micoplasmas animais como *M. bovis* e *M. agalactiae* possuem um papel determinante (FODDAI et al., 2005).

M. agalactiae (*Ma*) afetando, principalmente, cabras e ovelhas é o agente clássico etiológico da agalaxia contagiosa. Com tamanho entre 124-250 nm e ausência de motilidade é uma bactéria principalmente cocóide podendo assumir formas filamentosas que crescem a 37°C em meio Hayflick ou SP4 suplementado com glicose, apesar de não fermentar o carboidrato (BERGEY, 2010; KUMAR et al., 2014). Com muita sensibilidade a altas temperaturas, *Ma* pode ser inativado com exposição de 5 minutos a 60°C, 1 minuto a 100°C ou rapidamente inativado com exposição à radiação ultravioleta ou corantes. Pode ser destruído facilmente com desinfetantes de uso comum (KUMAR et al., 2014).

M. agalactiae está intimamente relacionado com *M. bovis*, possuindo apenas oito nucleotídeos de diferença das sequências de RNAr 16s, correspondendo a 99,5% de similaridade de nucleotídeos (CHÁVEZ GONZÁLEZ et al., 1995). Além disso, possui 10-18%

do seu genoma codificador submetido a transferência horizontal de genes com organismos do grupo *Mycoplasma mycoides*. Sendo ambos patógenos de ruminantes, o ambiente em comum compartilhado poderia ter favorecido a transferência de material genético entre esses micoplasmas (SIRAND-PUGNET et al., 2007).

Envolvidas em diversas funções, como absorção de nutrientes, aderência às células hospedeiras e imunomodulação, as lipoproteínas representam uma grande proporção do proteoma de superfície dos micoplasmas (CACCIOTTO et al., 2021). Os mecanismos de persistência e infecção do *Ma* ainda são desconhecidos, entretanto há em sua superfície uma diversidade antigênica através da alternância de alta frequência de lipoproteínas de superfície imunodominantes denominadas proteínas variáveis de *M. agalactiae* (Vpmas) (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2012). Outras proteínas lipossolúveis com potencial antigênico do micoplasma em questão também já foram identificadas, como: P80 (TOLA et al., 2001, 1997), P40 (FLEURY et al., 2002), P48 (ROSATI et al., 2000), MAG_1560 e MAG_6130 (BARBOSA et al., 2020). Além das proteínas de membrana que possuem papel fundamental na patogênese do micoplasma, há a formação de biofilmes prolíficos (MCAULIFFE et al., 2006), a capacidade de invasão celular (HEGDE et al., 2014), a produção de peróxido de hidrogênio (KHAN; MILES; NICHOLAS, 2005) e a digestão de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) (CACCIOTTO et al., 2016).

Na inibição do crescimento de *M. agalactiae*, tetraciclinas, quinolonas e macrolídeos (com exceção de eritromicina) são antibióticos eficazes (ANTUNES et al., 2008; PRATS-VAN DER HAM et al., 2017b). Entretanto, é observado crescente resistência à macrolídeos pelo microrganismo associada a mutações de resistência (PRATS-VAN DER HAM et al., 2017a). A utilização de antibióticos é uma das medidas adotadas para controle da agalaxia contagiosa, ocasionada por *Ma*, entretanto a resistência a antibióticos pode levar a ineficiência de alguns tratamentos (BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013a).

2.5 Vacinas recombinantes

O reconhecimento e eliminação de patógenos através do estímulo de respostas imunes são os objetivos da administração de vacinas (MOYLE, 2017). Assim, a prevenção que as vacinas podem proporcionar frente aos sintomas de uma determinada doença, consequência do estabelecimento de uma infecção patogênica, ainda que não ocorra evitando completamente a infecção, é capaz de limitar suas consequências (LEO; CUNNINGHAM; STERN, 2011). Para

tratar de muitas doenças humanas e veterinárias, em maioria, as vacinas disponíveis dependem de tecnologias de patógenos vivos atenuados ou inativados. Apesar de serem utilizadas com sucesso para tratarem das enfermidades, ambas as técnicas possuem problemas associados e limitações que incluem economia de fabricação, eficácia protetora, cultivo do agente infeccioso *in vitro*, modo de apresentação, inocuidade, introdução de outros agentes infecciosos, dentre outros (FRANCIS, 2018).

Com os problemas associados a vacinas utilizando o organismo inteiro, uma abordagem opcional seria as vacinas de subunidade que em sua composição, para estimular uma resposta imune apropriada, baseia-se em componentes microbianos como, por exemplo, antígenos de carboidratos e proteínas ou peptídeos (MOYLE; TOTH, 2013, 2008). A vacina de subunidade tem como princípio básico o isolamento e transferência do gene responsável por codificar a molécula para um segundo organismo geralmente não patogênico, sendo produzida pelo hospedeiro heterólogo. A subunidade recombinante pode ser projetada para que seja aplicada como imunógeno purificado (LILJEQVIST; STÅHL, 1999). A produção de uma vacina de subunidade eficaz deve levar em consideração três componentes: antígenos específicos, imunoestimulantes e sistema de entrega (BOBBALA; HOOK, 2016). Dessa forma, para o desenvolvimento desse modelo vacinal é necessário o conhecimento dos antígenos microbianos que são capazes de estimular a imunidade protetora em resposta à infecção (MOYLE; TOTH, 2013). Esta abordagem é possível através da vacinologia reversa que permite a identificação sistemática de todos os antígenos potenciais de um patógeno a partir do genoma sequenciado e avanços da bioinformática (MORA et al., 2003).

Para o desenvolvimento de vacinas micoplasmáticas com novos alvos, é importante a identificação de proteínas de membrana dos micoplasmas, considerando que estas possuem um papel fundamental na sobrevivência e patogênese desses organismos (BARBOSA et al., 2020). Estudos que apresentam proteínas de membrana imunogênicas de *Mycoplasma agalactiae*, como a P40 (FLEURY et al., 2002), P30 (FLEURY et al., 2001), MAG_1560 e MAG_6130 (BARBOSA et al., 2020), P48 (CHESSA et al., 2009; ROSATI et al., 2000) proporcionam possibilidades para o desenvolvimento de vacinas recombinantes de subunidades para a doença ocasionada pelo microrganismo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a imunogenicidade de duas proteínas antigênicas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae* em modelo animal utilizando caprinos para constituição de vacinas recombinantes de subunidade contra agalaxia contagiosa.

3.2. Objetivo específico

I. Realizar a expressão e purificação de duas proteínas antigênicas recombinantes de *M. agalactiae*.

II. Avaliar a resposta humoral desencadeada por duas proteínas antigênicas recombinantes de *M. agalactiae* pela avaliação dos níveis de IgG nas amostras de soro dos animais inoculados com as duas proteínas antigênicas recombinantes purificadas e inoculados com bacterina por 181 dias.

III. Analisar a expressão gênica de marcadores inflamatórios desencadeada pela estimulação *in vitro* de células sanguíneas do sangue periférico (PBMC) obtidas de animais antes e depois da imunização com as proteínas antigênicas recombinantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Proteínas recombinantes

4.1.1. Expressão e purificação de proteínas antigênicas

As proteínas antigênicas recombinantes utilizadas nesse estudo, foram a P40 (42 KDa) e MAG_1560 (32 KDa), sendo a P40 anteriormente caracterizada por Fleury (2002) e a MAG_1560 identificada e caracterizadas quanto a sua antigenicidade utilizando soro de caprinos naturalmente infectados em um trabalho realizado dentro do nosso grupo de pesquisa (BARBOSA et al., 2020). Para a expressão proteica, foi utilizada a cepa de *E. coli BL21 Star™ (DE3) One Shot*® transformadas contendo o vetor de interesse. Foram adicionados 100 µl (1:100) da bactéria transformada inicialmente em pré-inóculo de 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) contendo 100 µg/ml de canamicina e incubado *overnight* a 37°C. Em seguida, o volume total da cultura anterior foi inoculada em 1 litro do meio LB a 37 °C com agitação (200 rpm), durante 3 horas, até atingir a densidade óptica de 1.0 a 1.5 determinada em espectrofotômetro a 600 nm. Neste momento, para induzir a expressão proteica, 1mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) foi adicionado e incubado novamente em agitação a 17°C *overnight*. As células foram obtidas a partir da centrifugação a 10000 *xg* por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi homogeneizado em 200 mL do tampão tris-salina (Tris NaCl; 0,1M Tris, 0,5M NaCl, 10% glicerol, pH 8,5) apropriado contendo inibidor de proteases e lisadas por sonicação (1 minuto e 30 segundos de pulso; 10'' *on* e 15'' *off*; amplitude de 35%). A amostra após ser lisada foi centrifugada a 14.000 *xg* por 1 hora, a 4°C e o sobrenadante em seguida foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm. A solução filtrada foi dividida em alíquotas para purificação. Às alíquotas foram adicionados 20 mM de imidazol e realizada a purificação por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina quelante de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA) com diferentes concentrações de imidazol diluído em tris salina contendo glicerol.

O perfil de pureza das proteínas foi analisado através das frações cromatográficas do processo de purificação com a visualização em *SDS-PAGE* e confirmação através de *Western blot*. As soluções contendo a proteína recombinante foram submetidas a diálise em membrana *overnight* 4°C para remoção do imidazol, sendo assim utilizada a solução tampão sem o reagente.

4.1.2. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford utilizando como curva padrão, a partir da concentração de 4 mg/mL, diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 de soro albumina bovina (BSA). Como branco foi utilizado o diluente em que estava a proteína. Em uma microplaca, foram adicionados 10 µL da amostra teste ou padrão no poço em duplicata com 350µL do reagente de Bradford. Em seguida, a leitura da placa foi realizada a 595nm e os dados foram submetidos a análise para a determinação da concentração.

4.2. Cultivo e inativação de *Mycoplasma agalactiae*

O microrganismo *M. agalactiae* foi cultivado (1:10) inicialmente em 5 mL de meio SP4 suplementado durante 48 horas a 37°C. Subsequente, a cultura foi adicionada a 45 mL de meio para obtenção de um maior volume e incubado sob as mesmas condições. O cultivo foi centrifugado a 14.000 rpm durante 30 minutos para obtenção do *pellet* contendo o microrganismo e assim foi ressuspendido em 1 mL de PBS. Realizou-se diluição seriada (10^{-1} a 10^{-10}) de uma alíquota do cultivo e as concentrações de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} foram plaqueadas em meio SP4 sólido para determinar a CFU/ml. As placas foram incubadas a 37°C por 4 dias. A amostra de microrganismo foi inativada a 37°C com formaldeído a 0,5% durante 16h (AVRAMIDIS; VICTORATOS; YIANGOU, 2002). As células inativadas foram centrifugadas e lavadas com tampão tris-salina. A concentração de proteínas presente na alíquota antes da inativação foi determinada através da quantificação de proteínas totais pelo método BCA com detecção colorimétrica com o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.3. Extração de proteína de membrana

As proteínas de membrana do *M. agalactiae* a serem utilizadas no ELISA foram obtidas a partir da extração por meio da separação de fases com Triton X-114 (TX-114) de acordo com a metodologia de Rawadi (1996) com modificações. Dessa forma, o microrganismo foi cultivado em volume de 200mL durante 48h a 37°C. As células foram centrifugadas, lavadas e o *pellet* formado foi utilizado para prosseguir a extração. O *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL de Tris-EDTA (50mM Tris pH 8,0, 0.15M NaCL, 1mM EDTA). A solução foi adicionada TX-114 para concentração final de 2% e as amostras foram incubadas a 4°C durante 3 horas como homogeneização periódica a cada 30 minutos. Em seguida, o lisado com TX-114

foi incubado a 37°C durante 30 minutos para separação de fases, centrifugado a 10.000xg por 10 minutos e incubado em gelo por 5 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo e a fase TX-114 foi adicionado tampão Tris-EDTA sem o detergente, para remoção de proteínas de fase aquosa residuais, repetindo os passos de incubação a 37°C, centrifugação e gelo. Ao final, à fase TX o volume foi ajustado para 1mL com tampão Tris-EDTA e 2,5 vezes de volume de etanol absoluto foi adicionado para precipitação das proteínas de membrana com incubação *overnight* a -20°C. O material precipitado foi recuperado com centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos e ressuspendido em PBS contendo 1mM de PMSF (inibidor de proteases). As proteínas obtidas foram quantificadas através do método de Bradford.

4.4. Imunização dos animais

4.4.1. Formulação do imunizante experimental

Foi realizada a formulação de dois diferentes imunizantes, (A) contendo as proteínas recombinantes e (B) contendo o microrganismo inativado por formalina (bacterina). Para a composição da vacina A, foram utilizadas no total 100 µg de proteína recombinante (50 µg de P40 + 50 µg de MAG_1560) em 1 mL. A vacina B, foi formulada com 1 mL de *M. agalactiae* a 10⁹ CFU/mL. Ambas vacinas foram homogeneizadas com 1 mL de adjuvante completo de Freund's na primeira imunização, com volume final de solução de inoculação de 2 mL. Na segunda imunização, foi utilizada a mesma formulação, entretanto com o adjuvante incompleto de Freund's.

4.4.2. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados no experimento 12 cabras da raça Boer (n=12) provenientes de áreas não endêmicas de micoplasmose e submetidos sob o protocolo 077/2019 ao Conselho Ético de Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira. Os animais foram submetidos a anamnese e exame clínico, procedendo-se coleta de amostra para realização de ensaio moleculares para detecção de *Mollicutes* e *M. agalactiae*. Os animais considerados negativo para *Ma* foram utilizados no experimento. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com capim de corte e feno, água ad libitum e mantidos no *campus* da Universidade Estadual da Bahia (UESB). Os animais foram divididos igualmente em três grupos (n=4). O grupo I correspondente aos animais controle negativo, os quais foram apenas inoculados com tampão Tris-salina mais

adjuvante de Freund's completo ou incompleto; o grupo II foi inoculado com a vacina A; o grupo III, correspondente ao grupo bacterina, o qual foi inoculado com a vacina B. A imunização foi realizada através da via subcutânea. Após 28 dias, os grupos receberam reforço de dose (tris-salina, proteína recombinante ou bacterina).

4.5. Coletas de amostras sanguíneas

Amostras de 10 mL de sangue de cada cabra foram coletadas por venipunção da jugular externa, sendo conservadas em tubos estéreis com e sem EDTA. As coletas foram realizadas durante 6 meses, sendo a primeira coleta antes das inoculações (tempo zero), e com 7, 14, 21, 42, 56, 70, 91, 104, 128, 168 e 181 dias após a inoculação dos imunógenos. Em cada tempo de coleta, foram realizados a determinação dos níveis de produção de IgG específica para as proteínas produzidas.

4.6. Determinação dos níveis de produção de IgG específica para as proteínas produzidas

A detecção da IgG durante o período foi realizada por ensaio indireto de ELISA. Poços de microplacas foram sensibilizados com a proteína recombinante (50 ng por poço em tampão carbonato-bicarbonato), com extrato total de *M. agalactiae* (1 µg por poço em tampão carbonato-bicarbonato) obtido através da lise com tampão RIPA ou com proteínas de membrana de *Ma*, sendo incubadas a 4°C por 16 horas. A etapa do bloqueio foi conduzida com PBS 0,05% Tween-20 (PBS-T) contendo 10% de leite desnatado por duas horas. As amostras de soro dos animais coletadas do grupo do controle negativo (inoculados com tris-salina e adjuvante) e do controle positivo (inoculados com solução A ou B) foram diluídas em PBS-T contendo 5% de leite desnatado na proporção de 1:200 e incubadas por 1 hora e meia, a 37°C. Após lavagens em PBS-T, a imunoglobulina anti-IgG de caprino diluída em 1:2.000 em PBS-T contendo 5% de leite desnatado foi adicionada aos poços. Após incubação a 37°C por 1 hora e meia, a revelação foi conduzida com o o-fenilenodiamina dicloridrato (OPD), sendo interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura prosseguiu em leitor de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader), utilizando-se filtro de 490 nm de comprimento de luz.

4.7. Análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios desencadeada pela estimulação *in vitro* de células sanguíneas do sangue periférico (PBMC)

Foi realizado a análise comparativa da resposta de marcadores inflamatórios (IL-1β, IFNγ, IL-12 e para a molécula de complexo de histocompatibilidade MHC-II) em células

sanguíneas do sangue periférico obtidas dos animais antes das inoculações (tempo zero) e com 56 e 168 dias.

4.7.1. Isolamento de PBMC

Para a estimulação das células *in vitro* dos caprinos com subsequente avaliação da expressão gênica de citocinas, o isolamento de PBMC foi realizado. O volume de 5 mL de sangue periférico de cada animal coletado foi homogeneizado em 5mL (1:1) de PBS 1x (pH 7,4). Para isolamento das células foi utilizado o Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich), sendo então os 10 mL de sangue homogeneizado com PBS transferido vagarosamente para um tubo falcon contendo 3 mL de histopaque. O tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 20 minutos para a separação de fases. Após a centrifugação, o anel de células mononucleares de cada animal foi coletado e reunidos dentro do mesmo grupo experimental em tubo, formando assim o *pooled* de PBMC do grupo. O tubo contendo as células foi homogeneizado em 10 mL de PBS e centrifugado. Esse processo de lavagem foi realizado duas vezes. Ao final, o sedimento de células foi ressuscitado em 1 mL de meio RPMI suplementado (10% de soro fetal bovino e 100 U/ml de penicilina). Assim, prosseguiu com a contagem de células em câmara de Neubauer utilizando Azul de Tripán (1:9). Após a contagem o volume celular foi ajustado com a adição de RPMI suplementado para concentração de 2×10^5 células/ml.

4.7.2. Estimulação das células com as proteínas recombinantes e *Mycoplasma agalactiae*

As células isoladas e ajustadas a concentração desejada foram inoculadas com as proteínas recombinantes individualmente e com o *Ma* inativado, ambos antígenos foram utilizados em diferentes concentrações. O *pooled* de células foi adicionado em triplicata em placa de 24 poços. Então, as células foram estimuladas individualmente com a proteína P40 e MAG_1560 nas concentrações de 1 e 2 µg/ml e com o *Ma* inativado com 10^5 CFU/mL. O controle negativo foi incubado somente com adição de 20 µL de Tris-salina e o controle positivo com 5 µL de LPS (10 µg/ml). As células após serem estimuladas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 2 horas (WANG et al., 2016). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado e centrifugado para obtenção das células em suspensão e à placa foi adicionado 100 ul de tripsina com subsequente inativação, após 7 minutos, com soro fetal bovino para

obtenção das células aderentes. Às células obtidas foi adicionado RNAlater™ para posterior extração de RNA, conversão de cDNA e expressão gênica por PCR em tempo real.

4.7.3. Extração de RNA

O RNA das células armazenadas foi extraído com TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C em seguida *pellet* foi incubado a temperatura ambiente com 1 mL de TRIzol. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os tubos foram movimentados vigorosamente por 15 segundos. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Com a separação de fases, 600 µL correspondente a fase aquosa contendo o RNA, foram coletados e transferidos para outro microtubo onde foi adicionado volume igual de álcool 70%. O volume foi adicionado a uma coluna spin para purificação do material através do PureLink™ RNA Mini Kit de acordo com as instruções do fabricante. A solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. O líquido drenado foi descartado e à coluna foram feitas subsequentes lavagens com centrifugação. Por fim, à coluna spin foi adicionado 30 µL H₂O livre de RNase para eluição do material. A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugada e o volume final foi coletado e armazenado.

4.7.4. Conversão em DNAc

A partir do RNA extraído, foi realizada a conversão em DNA complementar (CDNA) para expressão gênica. A síntese foi realizada utilizando o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase™ (Invitrogen – Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Para o volume final de 13 µL o RNA foi adicionado ao mix A contendo 1 µL de Oligo d(T), 1 µL de DNTP (10mM) e água livre de RNase para ajuste do volume final. O mix A contendo o RNA foi aquecido a 65°C por 5 minutos em bloco seco e incubado em gelo por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado o mix B contendo 4 µL de tampão 5x, 1 µL de DTT (100mM), 1 µL de RNaseOUT™ e 1 µL de SuperScript IV. A solução foi incubada em termociclador a 55°C por 10 minutos e 80°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas para posterior análise de expressão gênica.

4.7.5. Expressão gênica

As amostras de DNAc foram submetidas a análise de expressão gênica de citocinas utilizando primers específicos para caprinos de IL-1 β (ANGULO et al., 2019), IFN- γ (WALIA; KUMAR; MITRA, 2015), IL-12 (SINGH et al., 2013) e para a molécula de complexo de histocompatibilidade MHC-II (AMILLS; FRANCINO; SÁNCHEZ, 1995). Além, da utilização de β -actina (MATOS et al., 2017) como controle endógeno para subsequente normalização dos dados. As reações foram realizadas através da RT-qPCR na plataforma StepOnePlus PCR Real Time System (Applied Biosystems™) utilizando o Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™). Os dados foram analisados utilizando o método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para diferenciação dos grupos na metodologia de ELISA. A análise de expressão gênica foi realizada com teste não paramétrico de Mann-Whitney. As análises foram consideradas com diferença estatisticamente significativas foram quando $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%. Foram utilizadas as médias e erro padrão da média para apresentação dos valores. As análises foram realizadas através do software GraphPad Prism 5.0.

5. REFERÊNCIAS

AGNONE, Annalisa et al. A comparison of the efficacy of commercial and experimental vaccines for contagious agalactia in sheep. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 112, n. 1–3, p. 230–234, 2013. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.12.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.022>.

ALCÂNTARA, Maria Dalva B.; CAMPOS, Ana Claudia; MELO, Marcia A.; FILHO, José M. Pereir.; NASCIMENTO, Elmiro R.; FARIAS, Aderaldo A.; SOUSA, Dalana R. M.; AZEVEDO, Edisio O. Resposta imunológica em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 561–564, 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000500001.

ALVES, Bruno H. L. S.; SILVA, José G.; MOTA, André R.; CAMPOS, Ana C.; JÚNIOR, José W. P.; SANTOS, Sandra B.; MOTA, Rinaldo A. Mycoplasma agalactiae in semen and milk of goat from Pernambuco state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 11, p. 1309–1312, 2013. DOI: 10.1590/s0100-736x2013001100004.

AMILLS, M.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A. Nested PCR allows the characterization of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 48, n. 3–4, p. 313–321, 1995. DOI: 10.1016/0165-2427(95)05442-9.

AMORES, Joaquín; SÁNCHEZ, Antonio; GÓMEZ-MARTÍN, Ángel; CORRALES, Juan C.; CONTRERAS, Antonio; DE LA FE, Christian. Surveillance of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subsp. capri in dairy goat herds. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 102, p. 89–93, 2012. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2011.09.008.

ANGULO, Miriam; REYES-BECERRIL, Martha; CEPEDA-PALACIOS, Ramón; TOVAR-RAMÍREZ, Dariel; ESTEBAN, María Ángeles; ANGULO, Carlos. Probiotic effects of marine *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 103, n. 5, p. 2339–2352, 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-09621-5.

ANTUNES, N. T.; TAVÍO, M. M.; ASSUNÇÃO, P.; ROSALES, R. S.; POVEDA, C.; DE LA FÉ, C.; GIL, M. C.; POVEDA, J. B. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Journal**, [S. l.], v. 177, n. 3, p. 436–438, 2008. DOI:

10.1016/j.tvjl.2007.05.008.

ARIZA-MIGUEL, Jaime; RODRÍGUEZ-LÁZARO, David; HERNÁNDEZ, Marta. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 8, p. 1, 2012. DOI: 10.1186/1746-6148-8-171. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/171>. Acesso em: 15 jul. 2021.

AVRAMIDIS, Nicolaos; VICTORATOS, Panayiotis; YIANGOU, Minas. Adjuvant regulation of cytokine profile and antibody isotype of immune responses to *Mycoplasma agalactiae* in mice. [S. l.], v. 88, p. 325–338, 2002.

BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; NASCIMENTO, E. R.; MELO, L. S. S.; MELO, C. B. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 60, n. 5, p. 1255–1258, 2008. DOI: 10.1590/s0102-09352008000500031. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000500031&lng=en&tlng=en.

BARBOSA, Maysa Santos et al. Novel antigenic proteins of *Mycoplasma agalactiae* as potential vaccine and serodiagnostic candidates. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 251, p. 108866, 2020. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108866.

BASEMAN, Joel B.; TULLY, Joseph G. Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by Their Notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 21–32, 1997. DOI: 10.3201/eid0301.970103.

BERGEY, David Hendricks. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Second ed. New York, NY: Springer New York, 2010. DOI: 10.1007/978-0-387-68572-4. Disponível em: <https://www.springer.com/series/4157>.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 848–73, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9567311>.

BOBBALA, Sharan; HOOK, Sarah. Is There an Optimal Formulation and Delivery Strategy for Subunit Vaccines? **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 2078–2097, 2016. DOI: 10.1007/s11095-016-1979-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-1979-0>.

BUONAVOGLIA, Domenico; GRECO, Grazia; CORRENTE, Marialaura; FIORELLA,

Maria; ABRAMO, Maria D.; LATRONICO, Francesca; FASANELLA, Antonio; DECARO, Nicola. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 16–19, 2010. DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.07.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.006>.

CACCIOTTO, Carla et al. *Mycoplasma* lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 12, 2016. DOI: 10.1111/CMI.12613.

CACCIOTTO, Carla; ADDIS, Maria Filippa; PAGNOZZI, Daniela; CHESSA, Bernardo; CORADDUZZA, Elisabetta; CARCANGIU, Laura; UZZAU, Sergio; ALBERTI, Alberto; PITTAU, Marco. The liposoluble proteome of *Mycoplasma agalactiae*: an insight into the minimal protein complement of a bacterial membrane. **BMC microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 1–12, 2010. DOI: 10.1186/1471-2180-10-225.

CACCIOTTO, Carla; ADDIS, Maria Filippa; PAGNOZZI, Daniela; CORADDUZZA, Elisabetta; PITTAU, Marco; ALBERTI, Alberto. Identification of conserved *Mycoplasma agalactiae* surface antigens by immunoproteomics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 236, p. 110239, 2021. DOI: 10.1016/j.vetimm.2021.110239. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110239>. Acesso em: 6 jul. 2021.

CAMPOS, A. C.; TELES, J. A. A.; AZEVEDO, E. O.; NASCIMENTO, E. R.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A.; CASTRO, R. S. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 84, p. 70–75, 2009. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2009.06.006.

CASTILHO JUNIOR, Regis Edgar et al. Detecting Mollicutes by PCR in goats in southwestern Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00517-z.

CASTRO-ALONSO, Ayoze; DE LA FE, Christian; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, Antonio; RODRÍGUEZ, Francisco; ANDRADA, Marisa; POVEDA, José B.; HERRÁEZ, Pedro. Chronological and immunohistochemical characterization of the mammary immunoinflammatory response in experimental caprine contagious agalactia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 136, n. 1–2, p. 43–54, 2010. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.02.005.

CHÁVEZ GONZÁLEZ, Y. R.; ROS BASCUÑANA, C.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, Jens G.; FERNÁNDEZ MOLINA, C.; JOHANSSON, K. E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 1–2, p. 183–90, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604550>.

CHAZEL, Myriam; TARDY, Florence; LE GRAND, Dominique; CALAVAS, Didier; POUMARAT, François. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 6, p. 32, 2010. DOI: 10.1186/1746-6148-6-32. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/32>. Acesso em: 15 jul. 2021.

CHESSA, Bernardo; PITTAU, Marco; PURICELLI, Maria; ZOBBA, Rosanna; CORADDUZZA, Elisabetta; DALL'ARA, Paola; ROSATI, Sergio; POLI, Giorgio; ALBERTI, Alberto. Genetic immunization with the immunodominant antigen P48 of *Mycoplasma agalactiae* stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 414–420, 2009. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.09.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.09.010>.

CHOPRA-DEWASTHALY, Rohini et al. Role of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* pathogenesis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 3, p. 307–322, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.01010.x.

CORRALES, J. C.; ESNAL, A.; DE LA FE, C.; SÁNCHEZ, A.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J. B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 68, n. 1–2, p. 154–166, 2007. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448806002513>.

DAMASCENO, Edgar Marques; PINHEIRO, Raymundo Rizado; ANDRIOLI, Alice; ALVES, Francisco Selmo Fernandes; LIMA, Ana Milena César; PEIXOTO, Renato Mesquita; ARAÚJO, Juscilânia Furtado; DAMASCENO, Mariana Siqueira; BRANDÃO, Iane Sousa. Seroprevalence and associated risk factors of *Mycoplasma agalactiae* and investigation of coinfection with the caprine lentivirus in Rio Grande do Norte, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 2111–2117, 2020. DOI: 10.1007/s11250-020-02234-5.

DE AZEVEDO, Edisio Oliveira et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: First report. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 576–581, 2006. DOI: 10.1590/S1517-83822006000400033.

DE LA FE, Christian; ASSUNÇÃO, Patricia; SAAVEDRA, Pedro; RAMÍREZ, Ana; POVEDA, José B. Field trial of a combined vaccine against caprine contagious agalactia: Humoral immune response in lactating goats. **Veterinary Journal**, [S. l.], v. 174, n. 3, p. 610–615, 2007. a. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.10.021.

DE LA FE, Christian; ASSUNÇÃO, Patricia; SAAVEDRA, Pedro; TOLA, Sebastiana; POVEDA, Carlos; POVEDA, José B. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. **Vaccine**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 2340–2345, 2007. b. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.11.050. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06012916>.

DHARA, K. C.; RAY, N.; TARAPHDER, S.; GUHA, S. Milk production performance of Black Bengal goats in West Bengal. **International Journal of Livestock Production**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 17–20, 2012. DOI: 10.5897/ijlp10.035.

DUBEUF, Jean Paul; BOYAZOGLU, Jean. An international panorama of goat selection and breeds. **Livestock Science**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 225–231, 2009. DOI: 10.1016/j.livsci.2008.07.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2008.07.005>.

ESCAREÑO, Luis; SALINAS-GONZALEZ, Homero; WURZINGER, Maria; IÑIGUEZ, Luiz; SÖLKNER, Johann; MEZA-HERRERA, Cesar. Dairy goat production systems: Status quo, perspectives and challenges. **Tropical Animal Health and Production**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 17–34, 2012. DOI: 10.1007/s11250-012-0246-6.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations statistical databases**. 2019.

FILIOUSSIS, G.; GIADINIS, N. D.; PETRIDOU, E. J.; KARAVANIS, E.; PAPAGEORGIOU, K.; KARATZIAS, H. Short communications: Congenital polyarthritis in goat kids attributed to *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 169, n. 14, 2011. DOI: 10.1136/vr.d4627.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; SCHLATTER, Y.; FREY, J.; VILEI, E. M. Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 39, n. 8, p. 2814–2822, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.8.2814-2822.2001.

FLEURY, Bénédicte; BERGONIER, Dominique; BERTHELOT, Xavier; PETERHANS, Ernst; FREY, Joachim; VILEI, Edy M. Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma*

agalactiae. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 70, n. 10, p. 5612–5621, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.10.5612-5621.2002. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.70.10.5612-5621.2002>.

FODDAI, A.; IDINI, G.; FUSCO, M.; ROSA, N.; DE LA FE, C.; ZINELLU, S.; CORONA, L.; TOLA, S. Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. **Molecular and Cellular Probes**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 207–212, 2005. DOI: 10.1016/j.mcp.2004.11.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890850804001100>.

FRANCIS, Michael James. Recent Advances in Vaccine Technologies. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 231–241, 2018. DOI: 10.1016/j.cvsm.2017.10.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561617301195>.

GÓMEZ-MARTÍN, A.; UC, N.; VIEIRA, L. A.; GADEA, J.; CADENAS, J.; SÁNCHEZ, A.; DE LA FE, C. Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. **Theriogenology**, [S. l.], v. 83, n. 5, p. 911–919, 2015. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.029>. Acesso em: 13 jul. 2021.

GÓMEZ-MARTÍN, Ángel; AMORES, Joaquín; PATERNA, Ana; DE LA FE, Christian. **Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control** *Veterinary Journal*, 2013. a. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.04.015.

GÓMEZ-MARTÍN, Ángel; SÁNCHEZ, Antonio; AMORES, Joaquín; CORRALES, Juan C.; CONTRERAS, Antonio; DE LA FE, Christian. Effect of marbofloxacin on mycoplasma carrier state and sperm quality in goat bucks. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 112, n. 1–3, p. 186–190, 2013. b. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.10.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.10.012>.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. **Molecular and Cellular Probes**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 21–25, 2001. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0337.

HEGDE, Shivanand; HEGDE, Shrilakshmi; SPERGSER, Joachim; BRUNTHALER, René; ROSENGARTEN, Renate; CHOPRA-DEWASTHALY, Rohini. In vitro and in vivo cell

invasion and systemic spreading of *Mycoplasma agalactiae* in the sheep infection model. **International Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 304, n. 8, p. 1024–1031, 2014.

DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.07.011. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.011>.

HENTSCHEL, Juliane; MÜHLRADT, Peter F. *Mycoplasma, Infection and Immunity*. In: **Encyclopedia of Immunology**. [s.l.] : Elsevier, 1998. p. 1798–1802. DOI: 10.1006/rwei.1999.0453. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656004655>.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM. Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, segundo o Brasil, as Grandes Regiões e as Unidades da Federação**. 2017.

IBGE. **Censo agropecuário - Número de estabelecimentos agropecuários com caprinos, Efetivos, Venda e Produção de leite, por tipologia, condição do produtor em relação às terras e grupo de cabeças de caprinos**. 2019.

JAYĚ, Maryne; TARDY, Florence. <p>Contagious Agalactia In Sheep And Goats: Current Perspectives</p>. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, [S. l.], v. Volume 10, p. 229–247, 2019. DOI: 10.2147/vmrr.s201847.

KHAN, L. A.; MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. J. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of In vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂. **Veterinary Research Communications**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 181–188, 2005. DOI: 10.1023/B:VERC.0000047506.04096.06.

KIZIL, Omer; OZDEMIR, Haydar. Clinical, haematological and biochemical studies in goats naturally infected with *Mycoplasma agalactiae*. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 325–328, 2006.

KRAUSE, D. C.; LEITH, D. K.; BASEMAN, J. B. Reacquisition of specific proteins confers virulence in *Mycoplasma pneumoniae*. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 830–836, 1983. DOI: 10.1128/iai.39.2.830-836.1983.

KUMAR, Amit; RAHAL, Anu; CHAKRABORTY, Sandip; VERMA, Amit Kumar; DHAMA, Kuldeep. *Mycoplasma agalactiae*, an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. **Veterinary Medicine International**, [S. l.], v. 2014, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1155/2014/286752.

LACASTA, D.; FERRER, L. M.; RAMOS, J. J.; GONZÁLEZ, J. M.; ORTÍN, A.;

FTHENAKIS, G. C. Vaccination schedules in small ruminant farms. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 181, n. 1–2, p. 34–46, 2015. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.018>.

LAMBERT, M. C. Agalaxie contagieuse des brebis et des chèvres. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 681–711, 1987. DOI: 10.20506/rst.6.3.308.

LEO, Oberdan; CUNNINGHAM, Anthony; STERN, Peter L. Vaccine immunology. **Perspectives in Vaccinology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 25–59, 2011. DOI: 10.1016/j.pervac.2011.05.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.002>.

LILJEQVIST, Sissela; STÅHL, Stefan. Production of recombinant subunit vaccines: Protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 1–33, 1999. DOI: 10.1016/S0168-1656(99)00107-8.

LORIA, G. R.; PULEIO, R.; FILIOUSSIS, G.; ROSALES, R. S.; NICHOLAS, R. A. J. Contagious agalactia: costs and control revisited. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 695–702, 2019. DOI: 10.20506/rst.38.3.3018.

LORIA, G. R.; SAMMARTINO, C.; NICHOLAS, R. a. J.; AYLING, R. D. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin–spectinomycin. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 3–7, 2003. DOI: 10.1016/S0034-5288(03)00030-4.

LORUSSO, A.; DECARO, N.; GRECO, G.; CORRENTE, M.; FASANELLA, A.; BUONAVOGLIA, D. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 103, n. 4, p. 918–923, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03324.x.

LU, Christopher D.; MILLER, Beth A. Special Issue-Current status, challenges and prospects for dairy goat production in the Americas. **Asian-Australas J Anim Sci**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 1244–1255, 2019. DOI: 10.5713/ajas.19.0256. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0256>. Acesso em: 25 jul. 2021.

LUIGI GONÇALVES, André; DE PAULA LANA, Rogério; AUGUSTO MENDONÇA VIEIRA, Ricardo; SAMPAIO HENRIQUE, Douglas; BENTO MANCIO, Antonio; CARLOS PEREIRA, José. Revista Brasileira de Zootecnia Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. [S. l.], n. 2, p. 366–376, 2008. Disponível em:

www.sbz.org.br. Acesso em: 26 jul. 2021.

MADANAT, A.; ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. **Acta Veterinaria Brno**, [S. l.], v. 70, n. 4, p. 403–412, 2001. DOI: 10.2754/avb200170040403. Disponível em: <https://actavet.vfu.cz/70/4/0403/>.

MATOS, L. et al. Protective immune responses during prepatency in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 242, n. March, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.04.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.016>.

MCAULIFFE, Laura; ELLIS, Richard J.; MILES, Katie; AYLING, Roger D.; NICHOLAS, Robin A. J. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. **Microbiology**, [S. l.], v. 152, n. 4, p. 913–922, 2006. DOI: 10.1099/mic.0.28604-0.

MILLER, Beth A.; LU, Christopher D. Special Issue-Current status of global dairy goat production: an overview. **Asian-Australas J Anim Sci**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 1219–1232, 2019. DOI: 10.5713/ajas.19.0253. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0253>. Acesso em: 15 jul. 2021.

MORA, Marirosa; VEGGI, Daniele; SANTINI, Laura; PIZZA, Mariagrazia; RAPPUOLI, Rino. Reverse vaccinology. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 459–464, 2003. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02689-8.

MORAND-FEHR, P.; BOUTONNET, J. P.; DEVENDRA, C.; DUBEUF, J. P.; HAENLEIN, G. F. W.; HOLST, P.; MOWLEM, L.; CAPOTE, J. Strategy for goat farming in the 21st century. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 175–183, 2004. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2003.08.013.

MOYLE, Peter Michael. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 375–389, 2017. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.005>.

MOYLE, Peter Michael; TOTH, Istvan. Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. **ChemMedChem**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 360–376, 2013. DOI: 10.1002/cmdc.201200487. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201200487>.

MOYLE, Peter; TOTH, Istvan. Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 506–516, 2008. DOI: 10.2174/092986708783503249.

NICHOLAS, R. **The veterinary significance of mycoplasmas. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 1998. DOI: 10.1385/0-89603-525-5:17.

NICHOLAS, R. A. J. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 145–149, 2002. DOI: 10.1016/S0921-4488(02)00095-0.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; LORIA, G. R. Ovine mycoplasmal infections. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 76, n. 1–2, p. 92–98, 2008. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.12.014.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; MCAULIFFE, L. Vaccines for Mycoplasma Diseases in Animals and Man. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 140, n. 2–3, p. 85–96, 2009. DOI: 10.1016/j.jcpa.2008.08.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.08.004>.

NICOLET, J. Animal mycoplasmoses: A general introduction. **OIE Revue Scientifique et Technique**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 1233–1240, 1996. DOI: 10.20506/rst.15.4.982.

NKANDO, Isabel et al. Recombinant Mycoplasma mycoides proteins elicit protective immune responses against contagious bovine pleuropneumonia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 171, p. 103–114, 2016. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.010>.

OIE. OIE. CONTAGIOUS AGALACTIA. In: OIE Terrestrial Manual 2018, Chapter 3.7.3 - Contagious Agalactia. [S. l.], n. Mcc, 2018. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.03_CONT_AGALACT.pdf.

OIE. **Disease situation OIE-WAHIS; 2016-2019**. 2019. Disponível em: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>.

OIE. **OIE list of notifiable terrestrial and aquatic animal diseases**. 2021. Disponível em: https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/?_tax_animal=terrestrials%2Csheep-and-goats&_tax_diseases=oie-listed.

ORAVCOVÁ, Katarína; LÓPEZ-ENRÍQUEZ, Lorena; RODRÍGUEZ-LÁZARO, David;

HERNÁNDEZ, Marta. Mycoplasma agalactiae p40 gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: Assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 445–450, 2009. DOI: 10.1128/JCM.01442-08.

PEIXOTO, Renato Mesquita; ANDRIOLI, Alice; PINHEIRO, Raymundo Rizaldo; ALVES, Francisco Selmo Fernandes; SANTOS, Vanderlan Warlington Souza Dos; SOUSA, Maximiana Mesquita De; AZEVEDO, Dalva Alana Aragão De; DAMASCENO, Edgar Marques; TEIXEIRA, Maria Fátima da Silva. Mycoplasma agalactiae em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 46, n. 85, p. 1–7, 2018.

PERDIGÃO, Nivea Regina de Oliveira Felisberto; OLIVEIRA, Leandro Silva; CORDEIRO, Ana Gabriela Pombo Celles. Sistema de produção de caprinos leiteiros. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, [S. l.], p. 1–6, 2016.

POUMARAT, François; LE GRAND, Dominique; GAURIVAUD, Patrice; GAY, Emilie; CHAZEL, Myriam; GAME, Yvette; BERGONIER, Dominique. Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by Mycoplasma agalactiae. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 8, p. 1–12, 2012. DOI: 10.1186/1746-6148-8-109.

POVEDA, J. B. Biochemical characteristics in mycoplasma identification. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 104, p. 69–78, 1998. DOI: 10.1385/0-89603-525-5:69.

PRATS-VAN DER HAM, Miranda; TATAY-DUALDE, Juan; DE LA FE, Christian; PATERNA, Ana; SÁNCHEZ, Antonio; CORRALES, Juan C.; CONTRERAS, Antonio; GÓMEZ-MARTÍN, Ángel. Presence of Mycoplasma agalactiae in semen of naturally infected asymptomatic rams. **Theriogenology**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 791–794, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.033>. Acesso em: 13 jul. 2021.

PRATS-VAN DER HAM, Miranda; TATAY-DUALDE, Juan; DE LA FE, Christian; PATERNA, Ana; SÁNCHEZ, Antonio; CORRALES, Juan Carlos; CONTRERAS, Antonio; GÓMEZ-MARTÍN, Ángel. Molecular resistance mechanisms of Mycoplasma agalactiae to macrolides and lincomycin. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 211, p. 135–140, 2017. a. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.10.012. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.10.012>. Acesso em: 30 ago. 2020.

PRATS-VAN DER HAM, Miranda; TATAY-DUALDE, Juan; DE LA FE, Christian; PATERNA, Ana; SÁNCHEZ, Antonio; CORRALES, Juan Carlos; CONTRERAS, Antonio; GÓMEZ-MARTÍN, Ángel. Molecular resistance mechanisms of *Mycoplasma agalactiae* to macrolides and lincomycin. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 211, p. 135–140, 2017. b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.10.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113517306922>. Acesso em: 30 ago. 2020.

RAWADI, Georges; ROMAN-ROMAN, Sergio. *Mycoplasma* membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 637–643, 1996. DOI: 10.1128/iai.64.2.637-643.1996.

RAZIN, S.; JACOBS, E. *Mycoplasma* adhesion. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 138, n. 3, p. 407–422, 1992. DOI: 10.1099/00221287-138-3-407. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-138-3-407>.

RAZIN, Shmuel; YOGEV, David; NAOT, Yehudith. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 1094–156, 1998. Disponível em: <https://mmbr.asm.org/content/62/4/1094.long>.

RAZIN, Shmuel. Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 100, n. 1–3, p. 423–431, 1992. DOI: 10.1016/0378-1097(92)90241-F.

RAZIN, Shmuel. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes). In: DWORKIN, Martin; FALKOW, Stanley; ROSENBERG, Eugene; SCHLEIFER, Karl-Heinz; STACKEBRANDT, Erko (org.). **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer US, 2006. p. 836–904. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_29. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/0-387-30744-3_29.

RAZIN, Shmuel; HERRMANN, Richard. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. Boston, MA: Springer US, 2002. DOI: 10.1007/b113360. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/b113360>.

RAZIN, Shmuel; OLIVER, Ofra. Morphogenesis of *Mycoplasma* and Bacterial L-form Colonies. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 225–237, 1961. DOI: 10.1099/00221287-24-2-225. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-24-2-225>.

RIVERA-TAPIA, José Antonio; CEDILLO-RAMÍREZ, María Lilia; JUÁREZ, Constantino Gil. Some biological features of mollicutes. **Revista latinoamericana de microbiología**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 53–7, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063771>.

ROSATI, S.; ROBINO, P.; FADDA, M.; POZZI, S.; MANNELLI, A.; PITTAU, M. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 71, n. 3–4, p. 201–210, 2000. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00164-9.

SANTONA, Antonella; CARTA, Franco; FRAGHÍ, P.; TURRINI, Franco. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 171–176, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.1.171-176.2002.

SINGH, P. K.; SINGH, S. V.; SAXENA, V. K.; SINGH, M. K.; SINGH, A. V.; SOHAL, J. S. Expression Profiles of Different Cytokine Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Goats Infected Experimentally with Native Strain of *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis. **Animal Biotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 187–197, 2013. DOI: 10.1080/10495398.2012.762008.

SIRAND-PUGNET, Pascal et al. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 744–758, 2007. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030075.

STRUGNELL, Richard; ZEPP, Fred; CUNNINGHAM, Anthony; TANTAWICHEN, Terapong. Vaccine antigens. **Understandin Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 61–88, 2011. DOI: 10.1016/j.pervac.2011.05.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.003>.

SUBRAMANIAM, S.; BERGONIER, D.; POUMARAT, F.; CAPAUL, S.; SCHLATTER, Y.; NICOLET, J.; FREY, J. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 161–169, 1998. DOI: 10.1006/mcpr.1998.0160.

TATAY-DUALDE, Juan; PRATS-VAN DER HAM, Miranda; DE LA FE, Christian; PATERNA, Ana; SÁNCHEZ, Antonio; CORRALES, Juan Carlos; CONTRERAS, Antonio; GÓMEZ-MARTÍN, Ángel. Mutations in the quinolone resistance determining region conferring resistance to fluoroquinolones in *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary**

Microbiology, [S. l.], v. 207, n. June, p. 63–68, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.06.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.003>.

TOLA, S.; CROBEDDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 202, n. 1, p. 45–50, 2001. DOI: 10.1016/S0378-1097(01)00234-8.

TOLA, S.; MANUNTA, D.; ROCCA, S.; M. ROCCHIGIANI, A.; IDINI, G.; P. ANGIOI, P.; LEORI, G. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. **Vaccine**, [S. l.], v. 17, n. 22, p. 2764–2768, 1999. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00070-5.

TOLA, Sebastiana; MANUNTA, Daniela; COCCO, Monica; TURRINI, Franco; ROCCHIGIANI, Angela M.; IDINI, Graziano; ANGIOI, Antonio; LEORI, Guido. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 154, n. 2, p. 355–362, 1997. DOI: 10.1016/S0378-1097(97)00353-4. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12667.x>.

VASCONCELOS, Evandro; JUNIOR, Holanda; ROCHA DE MEDEIROS², Henrique; BERETTA, Hélio Luiz; MONTE³, Dal; GERMANO DA COSTA, Roberto; CAVALCANTI, Edgard; FILHO, Pimenta. Custo De Produção De Leite De Cabra Na Região Nordeste. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, [S. l.], p. 1–13, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/534170/custo-de-producao-de-leite-de-cabra-na-regiao-nordeste>.

VERBISCK-BUCKER, G.; GONZÁLEZ-CANDELA, M.; GALIÁN, J.; CUBERO-PABLO, M. J.; MARTÍN-ATANCE, P.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* infection in free-ranging Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Andalusia, southern Spain. **Journal of wildlife diseases**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 369–80, 2008. DOI: 10.7589/0090-3558-44.2.369.

WALIA, Vishakh; KUMAR, Rohit; MITRA, Abhijit. Lipopolysaccharide and Concanavalin A Differentially Induce the Expression of Immune Response Genes in Caprine Monocyte Derived Macrophages. **Animal Biotechnology**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 298–303, 2015. DOI: 10.1080/10495398.2015.1013112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10495398.2015.1013112>.

WANG, Yang; LIU, Suli; LI, Yuan; WANG, Qi; SHAO, Jiari; CHEN, Ying; XIN, Jiuqing. Mycoplasma bovis-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 β production through the NF- κ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. **Developmental & Comparative Immunology**, [S. l.], v. 55, p. 111–118, 2016. DOI: 10.1016/j.dci.2015.10.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.017>.

CAPÍTULO 1

Respostas imunológicas induzidas por P40 e MAG_1560 de *Mycoplasma agalactiae* em modelo animal utilizando caprinos

Respostas imunológicas induzidas por P40 e MAG_1560 de *Mycoplasma agalactiae* em modelo animal utilizando caprinos

Beatriz Almeida Sampaio^a, Maysa Santos Barbosa^b, Manoel Neres Santos Júnior^c, Bruna Carolina de Brito Guimarães^c, Emily Andres^a, Agatha Morgana Bertoti da Silva^a, Camila Pacheco Gomes^c, Lucas Santana Coelho Silva^c, Guilherme Barreto Campos^a, Jorge Timenetsky^b, Bruno Lopes Bastos^a, Lucas Miranda Marques^{a,b,c}

^a Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. Rua Hormindo Barros, 58, Candeias, 45029-094. Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

^b Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil. Avenida Professor Lineu Prestes, 2415, Butantã, 05508-900. São Paulo, Brasil.

^c Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil. Rod. Jorge Amado, Km a6, Salobrinho, 55662-900. Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Corresponding author: E-mail: lmirandamarques@gmail.com (Lucas Marques). Mailing address: Rua Hormindo Barros, 58, Candeias, 45029-094. Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Phone/fax: +55 77 34292714

RESUMO

A agalaxia contagiosa é uma doença causada classicamente pelo *Mycoplasma agalactiae* e afeta pequenos ruminantes no mundo todo sendo considerada endêmica em alguns países. Caracterizada por ocasionar mastite, agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite, a doença resulta em grandes perdas econômicas para pequenos e grandes produtores. Como alternativa as medidas imunoproláticas existentes, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante contra *M. agalactiae* sendo avaliada quanto a sua resposta imune específica em caprinos. Foram utilizadas 12 cabras, divididas em três grupos (controle, recombinante e bacterina). Os animais constituindo o grupo recombinante foram imunizados com uma solução de proteínas recombinantes, sendo essas, duas lipoproteínas de *M. agalactiae* (P40 e MAG_1560), enquanto o grupo bacterina foi imunizado com *M. agalactiae* inativado (10^9 CFU/ml). Ambas soluções foram emulsionadas em adjuvante de Freund's. Os animais foram avaliados pelo período de 181 dias quanto a produção de anticorpos IgG e resposta *in vitro* de PBMC's ao estímulo das proteínas recombinantes com análise posterior da expressão de IL-1 β , IFN- γ , IL-12 e MHC-II. Foi observado no soro dos animais imunizados com proteínas recombinantes a produção de anticorpos contra extrato total e proteínas de membrana de *M. agalactiae*. Os soros dos animais imunizados com bacterina também foram capazes de produzir anticorpos específicos principalmente contra a proteína recombinante MAG_1560. A avaliação do desenvolvimento da resposta imune através da expressão gênica de citocinas apresentou aumento de mRNA da citocina pró-inflamatória IL-1 β ao longo do tempo em resposta ao estímulo das proteínas P40 e MAG_1560 pelo grupo recombinante e bacterina. No grupo bacterina foi observada redução dos níveis de mRNA de IFN- γ , enquanto o grupo recombinante em resposta ao estímulo da P40 ocorreu aumento da expressão, mas nenhuma ou redução da expressão com a MAG_1560 foi observada. No grupo recombinante, a expressão citocina IL-12 em 168 dias tem aumento da expressão com o estímulo da P40 quando comparado a células não estimuladas e a MAG_1560 apresentou aumento a expressão com 56 dias. O grupo bacterina ao longo do tempo teve aumento na expressão de mRNA de IL-12. As proteínas foram capazes de estimular a expressão gênica em ambos os grupos de MHC-II. O modelo vacinal de subunidade aqui apresentado possui dados promissores de uma vacina capaz de induzir resposta celular e humoral. A produção de novas vacinas a partir de proteínas antigênicas recombinantes irá possibilitar uma alternativa as vacinas existentes (inativadas e atenuadas), de forma segura e eficaz, para a prevenção da agalaxia contagiosa contribuindo para a saúde animal com impacto econômico no aumento da produtividade caprina.

Palavras-chave: Agalaxia contagiosa; *M. agalactiae*; recombinante; subunidade; vacina;

INTRODUÇÃO

A agalaxia contagiosa (AC) é uma doença que atinge caprinos e ovinos conhecida desde 1816 quando foi relatada pela primeira vez na Itália. Entretanto, a sua natureza contagiosa só veio a ser notada anos mais tarde, ao ser observado que animais que pastavam em local após um rebanho infectado, acabava sendo afetado [1]. Sendo *M. agalactiae* o agente clássico da doença, esta pode ser ocasionada por outras três espécies micoplasmáticas, como: *Mycoplasma capricolum* subespécie *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* “large colony type” (*MmmLC*) e *Mycoplasma putrefaciens* (*Mp*) [2].

As vias mais comuns que o micoplasma pode adentrar no organismo do hospedeiro, são oral, respiratória ou mamária. Assim, é carreado através da circulação sanguínea se estabelecendo em outros órgãos do sistema onde desenvolvem uma resposta inflamatória como nas glândulas mamárias, olhos, articulações e linfonodos. Com isso, além de desenvolver bacteremia acompanhada por febre, sintomas como hipoagalaxia transitória à agalaxia abrupta e total, mastite, artrite, poliartrite, ceratoconjutivite podem ocorrer [3,4]. Abortos podem acontecer em fêmeas grávidas quando alterações nos órgãos genitais são observadas assim como a inflamação do útero [5]. Antibióticos são utilizados como medidas terapêuticas. Em contrapartida, é necessária a aplicação de uma dose terapêutica definida e por um período suficientemente longo, caso contrário, o efeito da antibioticoterapia pode ser reduzido ou nenhum com consequente disseminação dos agentes da doença no ambiente e possibilidade de desenvolvimento de estirpes resistentes [2–4].

As alternativas vacinais existentes para a doença baseiam-se na aplicação de vacinas inativadas ou atenuadas. Na região sul da Europa, vacinas comerciais inativadas por formalina direcionadas a *M. agalactiae* são mais utilizadas, enquanto na Turquia há a prevalência da aplicação de vacinas atenuadas [6]. No Brasil, ainda que a agalaxia contagiosa ocasionada por *Ma* tenha sido registrada no país [7–10] no mercado não há disponibilidade de vacinas e nenhuma legislação quanto a seu uso [11]. A aplicação das vacinas inativadas tendem a ser repetidas em períodos mais curtos, uma vez que a estimulação de anticorpos possui menor titulação e são menos persistentes [12]. Esse modelo de vacina inativada monovalente, reduz os sinais clínicos da agalaxia contagiosa, em contrapartida, não é sempre que é capaz de garantir completa prevenção contra o microrganismo [13]. Com a utilização das vacinas atenuadas as lesões articulares desaparecem, entretanto os animais através da lactação, apesar desta ser retomada a normalidade, continuam excretando o patógeno por vários meses. Em animais saudáveis que são vacinados como medida de prevenção, a infecção generalizada e o

desenvolvimento de sinais clínicos não ocorrem, mas pode apresentar infecção temporária no úbere [4].

Apesar dos mecanismos de persistência e infecção do *M. agalactiae* serem desconhecidos, há conhecimento limitado relacionado a sua diversidade antigênica de superfície que contribuem para sua patogenicidade, incluindo lipoproteínas de superfície imunodominantes com frequente alternância, que são as Vpmas (proteínas variáveis de *M. agalactiae*) [14], P40 [15], P48 [16], P80 [17,18], MAG_1000, MAG_1980, MAG_2220, MAG_4740, MAG_2430, phnD [19], MAG_1560 e MAG_6130 [20]. A identificação e caracterização de proteínas imunogênicas, possibilita o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e profilaxia contra a agalaxia contagiosa. No mesmo segmento que para outras micoplasmoses animais, estudos apresentam proteínas recombinantes com perfil antigênico e imunogênico para a possível composição de vacinas de subunidades, como para *M. hyopneumoniae* [21–23], *M. mycoides* subespécie *mycoides* [24,25], *M. ovipneumoniae* [26,27], *M. haemofelis* [28].

Duas lipoproteínas antigênicas de micoplasma (MAG_1560 e MAG_6130) identificadas e caracterizadas anteriormente no nosso grupo de pesquisa e a P40 [15] foram avaliadas quanto a sua antigenicidade, sendo reconhecidas por soros testados de caprinos e ovinos naturalmente infectados por *M. agalactiae* e apresentando potencial imunogênico com produção de anticorpos IgG em coelhos [20]. Dessa forma, esse estudo objetiva analisar a resposta imune em modelo caprino das proteínas MAG_1560 e P40 como potencial para a formulação de uma vacina recombinante para agalaxia contagiosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Expressão e purificação das proteínas recombinantes P40 e MAG_1560

Nesse estudo, foram utilizadas duas proteínas antigênicas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae*, a P40 (42 KDa) [15] e MAG_1560 (32 KDa) [20]. Para a expressão proteica, foi realizado um pré-inóculo em meio LB (Luria-Bertani) contendo canamicina utilizando a cepa de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® transformadas contendo o vetor de interesse e incubados *overnight* em rotação a 37°C. Posteriormente, o pré-inóculo foi transferido para um volume maior e incubado durante 3 horas, até atingir a densidade óptica de 1.0 a 1.5 a 600 nm. A expressão proteica então foi induzida com 1 mM de IPTG incubado novamente em agitação a 17°C *overnight*. As células foram obtidas a partir da centrifugação e

o *pellet* foi homogeneizado em tampão tris-salina (Tris NaCl; 0,1M Tris, 0,5M NaCl, 10% glicerol, pH 8,5) com inibidor de proteases e lisadas por sonicação. A amostra após ser lisada foi centrifugada e o sobrenadante contendo as proteínas de interesse foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 μ m. A solução filtrada então purificada em coluna contendo resina quelante de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA) com diferentes concentrações de imidazol. As proteínas foram visualizadas através de SDS-PAGE, confirmadas através de *Western blot* e realizada a diálise para remoção de imidazol residual. Assim, foram concentradas e quantificadas através da metodologia de Bradford com leitura em placa a 595 nm.

Inativação de *Mycoplasma agalactiae*

O isolado GM-139 de *M. agalactiae* foi cultivado durante 48h a 37°C em meio SP4 suplementado. O cultivo foi centrifugado e o sedimento foi ressuspenso em PBS. Foi realizada a diluição seriada da cultura com plaqueamento para determinar a CFU/ml. Com a obtenção do microrganismo, a amostra foi inativada com incubação a 37°C durante 16h com formaldeído a 0,5% [29]. Após o período, as células foram centrifugadas e ressuspenso em Tris-salina após a lavagem. Antes da inativação do microrganismo foi determinada a concentração de proteínas, usando soro albumina bovina (BSA) como padrão, através do método BCA com o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Extração de proteína de membrana

Com base na metodologia de Rawadi e Roman-Roman [30] com modificações foram extraídas as proteínas de membrana do *M. agalactiae* por meio da separação de fases com o detergente não-iônico Triton X-114 (TX-114). A bactéria foi cultivada e o sedimento de células formado após a centrifugação e houve remoção do meio de cultura do cultivo foi utilizado para a extração. A solução celular foi ressuspenso em Tris-EDTA (50mM Tris pH 8,0, 0.15M NaCL, 1mM EDTA) contendo 2% de TX-114 e incubadas durante 3 horas a 4°C. Posteriormente, foi incubado durante 30 minutos a 37°C para separação de fases, centrifugado e incubado em gelo por 5 minutos. Esse último processo, para remoção de proteínas de fase aquosa da porção TX, foi repetido três vezes com adição de tampão Tris-EDTA sem o detergente. À fase TX final foi adicionado o tampão Tris-EDTA e para precipitação das proteínas de membrana foi adicionado 2,5 vezes do volume de etanol absoluto com incubação

overnight a -20°C. Após a centrifugação o precipitado foi recuperado e ressuspendido em PBS. A concentração de proteínas de membrana obtida foi quantificada através do método de Bradford.

Imunização dos animais e grupos experimentais

Foram preparadas duas diferentes soluções imunizantes. A vacina A teve em sua composição 100 µg de proteína recombinante no total (50 µg de MAG_1560 + 50 µg de P40) em 1 mL. Para a formulação da vacina B, correspondente ao imunizante bacterina, foi adicionado 1 mL de *M. agalactiae* inativado a 10⁹ CFU/ml. Com volume final de solução de inoculação de 2 mL, na primeira imunização as vacinas A e B foram homogeneizadas com a adição de 1ml de adjuvante completo de Freund's (1:1) e na segunda dose, foi utilizada a mesma formulação, entretanto foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund's (1:1).

Para realizar a imunização, foram utilizadas fêmeas caprinas da raça Boer (n=12) com 5 meses de idade. A utilização dos animais foi aprovada pelo Conselho de ética de Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira (protocolo 077/2019). Os animais foram examinados e avaliados quanto a presença de *Mollicutes* e *M. agalactiae*. Foram utilizados no experimento aqueles considerados negativo para *Ma*. As cabras foram divididas em três grupos (n=4): (I) controle negativo, inoculados com tampão Tris-salina mais adjuvante de Freund's completo ou incompleto; (II) grupo recombinante inoculados com a vacina A; (III) grupo bacterina inoculado com a vacina B. A imunização foi realizada através da via subcutânea. Após 28 dias, os grupos receberam reforço de dose (tris-salina, proteína recombinante ou bacterina).

Os animais foram avaliados durante 6 meses através da coleta de sangue, em tubos estéreis com e sem EDTA, de cada cabra por venipunção da jugular externa. A primeira coleta foi realizada antes das inoculações (tempo zero) e 7, 14, 21, 42, 56, 70, 91, 104, 128, 168 e 181 dias após a inoculação dos imunógenos.

Determinação dos níveis de produção de IgG específica por ELISA indireto

Através do ensaio indireto de ELISA foi determinada a produção de anticorpos formada em resposta as proteínas ou bacterina. A técnica foi anteriormente padronizada quanto a utilização de antígeno. Poços de microplacas foram sensibilizados com extrato proteico total de *M. agalactiae* (1 µg/poço em tampão carbonato-bicarbonato) obtido a partir da lise com tampão RIPA, proteína recombinante P40 ou MAG_1560 (50 ng/poço em tampão carbonato-

bicarbonato) ou com proteínas de membrana de *Ma*, sendo incubadas a 4°C por 16 horas. As placas foram bloqueadas com PBS 0,05% Tween-20 (PBS-T) contendo 10% de leite desnatado. Os soros coletados dos animais de cada grupo foram diluídos (1:200) em PBS-T contendo 5% de leite desnatado e incubadas. Posteriormente os poços foram lavados com PBS-T e o anticorpo secundário anti-IgG de caprino diluído (1:2000) em PBS-T contendo 5% de leite desnatado foi adicionado. As placas foram incubadas e em seguida a revelação foi conduzida com o o-fenilenodiamina dicloridrato (OPD) com interrupção pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura foi realizada a 490 nm em leitor de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader).

Análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios desencadeada pela estimulação *in vitro* de células sanguíneas do sangue periférico (PBMC)

Foi realizado a análise comparativa da resposta de marcadores inflamatórios (IL-1 β , IFN γ , IL-12 e para a molécula de complexo de histocompatibilidade MHC-II) em células sanguíneas do sangue periférico obtidas dos animais antes das inoculações (tempo zero) e com 56 e 168 dias. As PBMC dos grupos vacinais foram isoladas para a estimulação das células *in vitro* dos caprinos com o período de 2 horas [30]. Foram utilizados 5 mL de sangue periférico de cada animal. O isolamento foi realizado utilizando o Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich). As células mononucleares de cada animal foram coletadas e formado *pooled* de PBMC do grupo experimental. Após as lavagens, ao sedimento de células foi adicionado meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100U/ml de penicilina para ressuspensão. O processo prosseguiu com a contagem de células em câmara de Neubauer utilizando Azul de Tripán. O volume celular foi ajustado para concentração de 2x10⁵ células/ml e em seguida o *pooled* de células foi adicionado em triplicata em placa de 24 poços. As células foram estimuladas com o *M. agalactiae* inativado com 10⁵ CFU/mL e com as proteínas P40 e MAG_1560 separadamente nas concentrações de 1 e 2 μ g/ml. Ao controle negativo foi adicionado Tris-salina e como controle positivo foi utilizado LPS. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 2 horas. As células em suspensão foram obtidas a partir da centrifugação do sobrenadante e as células aderidas a placa foram removidas com tripsina. As células obtidas foram armazenadas em RNAlater™.

Extração de RNA, síntese de cDNA e expressão gênica

A extração do RNA foi realizada com TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante e purificado através do PureLink™ RNA Mini Kit. A partir do RNAm extraído foi realizada a síntese em cDNA utilizando o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase™ (Invitrogen – Thermo Fisher). Foi analisada a expressão gênica da molécula de complexo de histocompatibilidade MHC-II [31] e de citocinas IL-1β [32], IFNγ [33], IL-12 [34]. Como controle endógeno foi utilizado β-actina [35]. As reações de RT-qPCR foram realizadas na plataforma StepOnePlus PCR Real Time System (Applied Biosystems™) com o Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™). A análise dos dados foi obtida através do método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do GraphPad-Prism 5.0 utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para diferenciação dos grupos de ELISA. Para análise de expressão gênica foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação de dois grupos. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%. Os valores foram apresentados como médias e erro padrão da média.

RESULTADOS

Purificação das proteínas

As proteínas P40 e MAG_1560 foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli* purificadas por cromatografia de afinidade com resina de níquel e o resultado da purificação pode ser visualizado em Western Blot (Fig. 1).

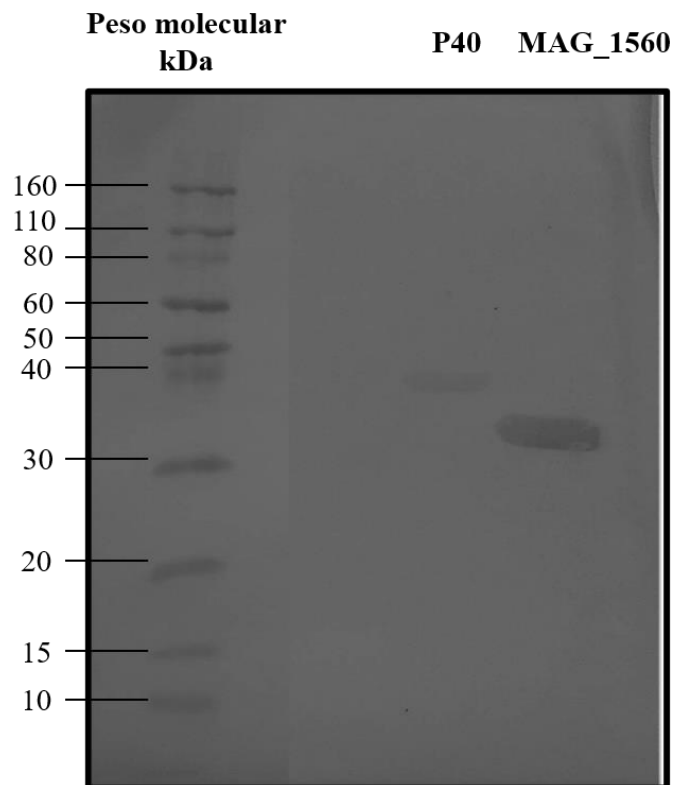


Fig. 1. Proteínas recombinantes purificadas visualizadas em Western Blot. Coluna 1: Peso molecular Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard; Coluna 2: P40 (42KDa); Coluna 3: MAG_1560 (32 KDa).

A vacina recombinante induziu alta taxa de produção de anticorpos IgG específicos

A produção de anticorpos IgG específicos por cada grupo foi avaliada durante o período de 181 dias em resposta as proteínas recombinantes inoculadas (P40 e MAG_1560), ao extrato proteico total e as proteínas de membrana de *Ma*. No grupo recombinante o sistema imune dos animais foi capaz de gerar uma elevada produção de anticorpos para ambas as proteínas inoculadas (Fig. 2A e 2B) que perdurou durante todo o período de análise apresentando capacidade imunogênica. O grupo imunizado com bacterina (Fig. 2B) teve produção de anticorpos específicos para a proteína MAG_1560 apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo controle imunizado somente com o tampão e adjuvante. Em resposta ao extrato proteico total de *Ma* (Fig. 2C), o grupo bacterina apresentou alta produção de anticorpos. Apesar de valores baixos apresentados do grupo recombinante em resposta ao extrato proteico total, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo recombinante e controle com 42, 128, 168 e 181 dias após a imunização. O soro de ambos os grupos, recombinante e bacterina, apresentaram produção de anticorpos durante os 181 dias em resposta as proteínas de membrana do *M. agalactiae*.

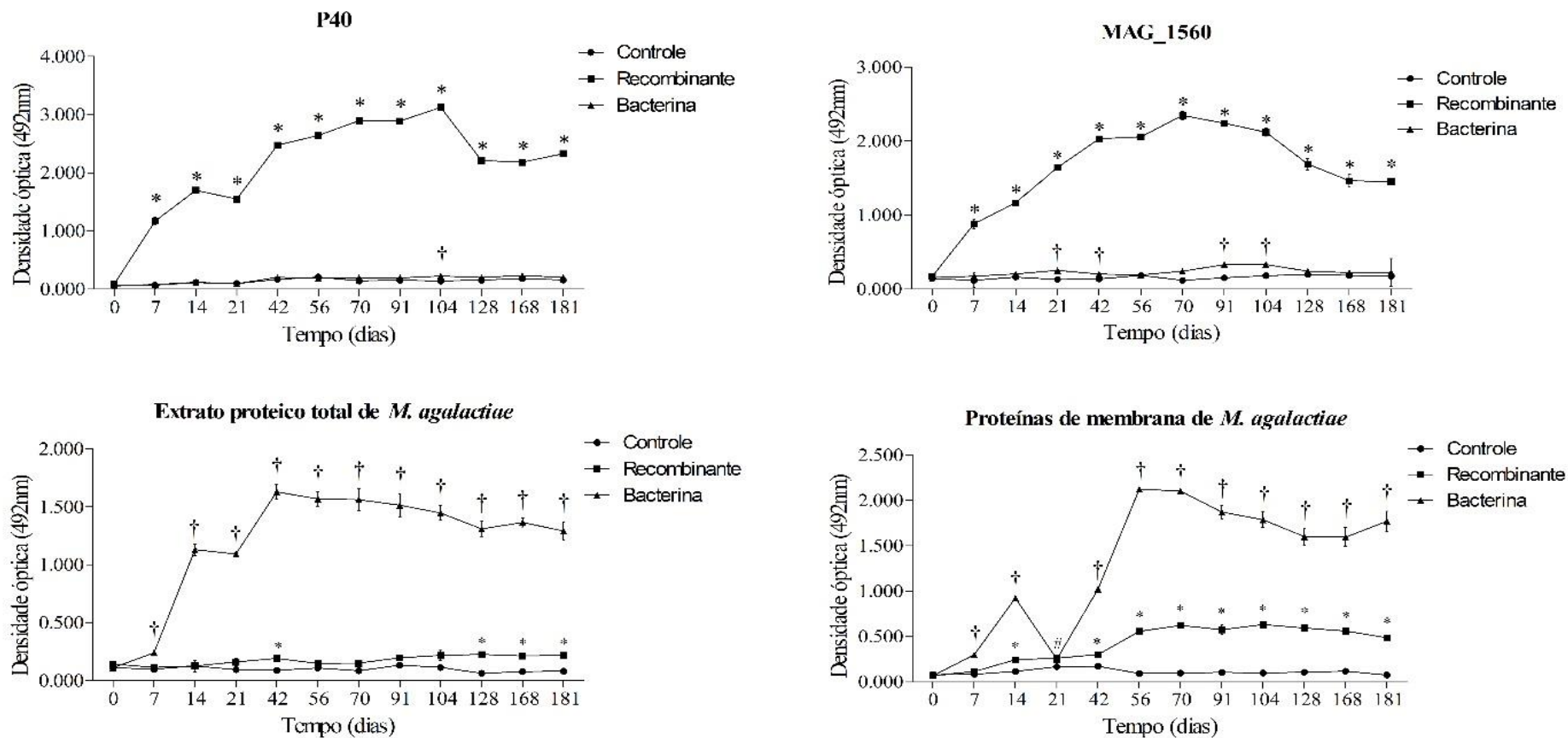


Fig. 2. ELISA indireto do soro de animais inoculados (controle, proteínas recombinantes e bacterina). (A) Produção de anticorpos em resposta a P40. (B) Produção de anticorpos em resposta a MAG_1560. (C) Produção de anticorpos em resposta ao extrato proteico total de *M. agalactiae*. (D) Produção de anticorpos em resposta as proteínas de membrana de *M. agalactiae*. Os grupos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos quando (#) diferente do grupo controle, (*) diferente do grupo controle e bacterina e (†) diferente do grupo controle e recombinante.

As proteínas P40 e MAG_1560 são capazes alterar a expressão gênica de citocinas e MHC-II nos diferentes grupos

A avaliação da expressão gênica das células mononucleares do sangue periférico isoladas dos animais foi avaliada antes da inoculação (0 dias), 56 dias e 168 dias após a imunização com estímulo *in vitro* em cultura de células com 2 horas de incubação com as proteínas P40 e MAG_1560. As células do grupo imunizado com proteínas recombinantes e com bacterina em resposta ao estímulo pela P40 em diferentes concentrações apresentaram aumento estatisticamente significativo na expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Fig. 3A e 3C) em 56 e 168 dias após a inoculação em comparação a antes da imunização. O aumento da expressão ocorreu também para o grupo bacterina em resposta a P40 com 56 e 168 dias em relação ao controle negativo, com exceção da concentração 2 μ g/ml que não apresentou diferença estatisticamente significativa com 56 dias. Em resposta a MAG_1560, o grupo recombinante apresentou aumento significativo para a concentração de 1 μ g/ml nos tempos após a inoculação para o gene IL-1 β (Fig. 3B). Enquanto o grupo bacterina apresentou aumento da expressão de IL-1 β para ambas as concentrações de MAG_1560 (Fig. 3D).

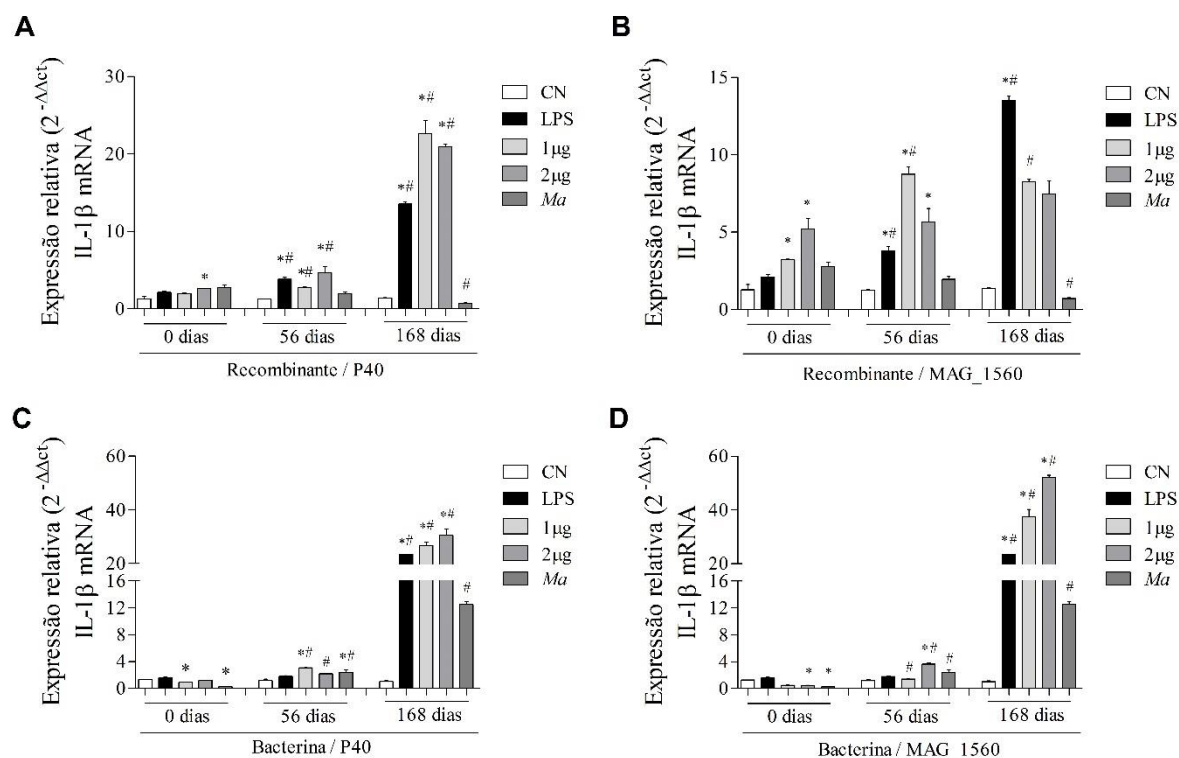


Fig. 3 Expressão gênica de IL-1 β de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bactéria antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo bactéria estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo bactéria estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

Em relação a expressão de IFN- γ , a proteína P40 também induziu o aumento da expressão do gene com estímulo a maior concentração da proteína (2 $\mu\text{g/ml}$) das células do grupo recombinante com 168 dias (Fig. 4A). Em resposta a MAG_1560, com 56 dias, o grupo recombinante apresentou redução da expressão gênica com diferença estatisticamente significativa para a concentração de 1 μg da proteína. Não foi apresentada diferença com 168 dias para ambas as concentrações da proteína MAG_1560. O grupo imunizado com bacterina, em comparação a antes da inoculação, apresentou com 56 dias baixa expressão para ambas as proteínas nas diferentes concentrações (Fig. 4C e 4D). Com 168 dias após a inoculação o grupo bacterina em resposta ao estímulo da P40 (Fig. 4C) apresentou baixa expressão do gene IFN- γ para as concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$ e para 2 ug/ml de MAG_1560 (Fig. 4D).

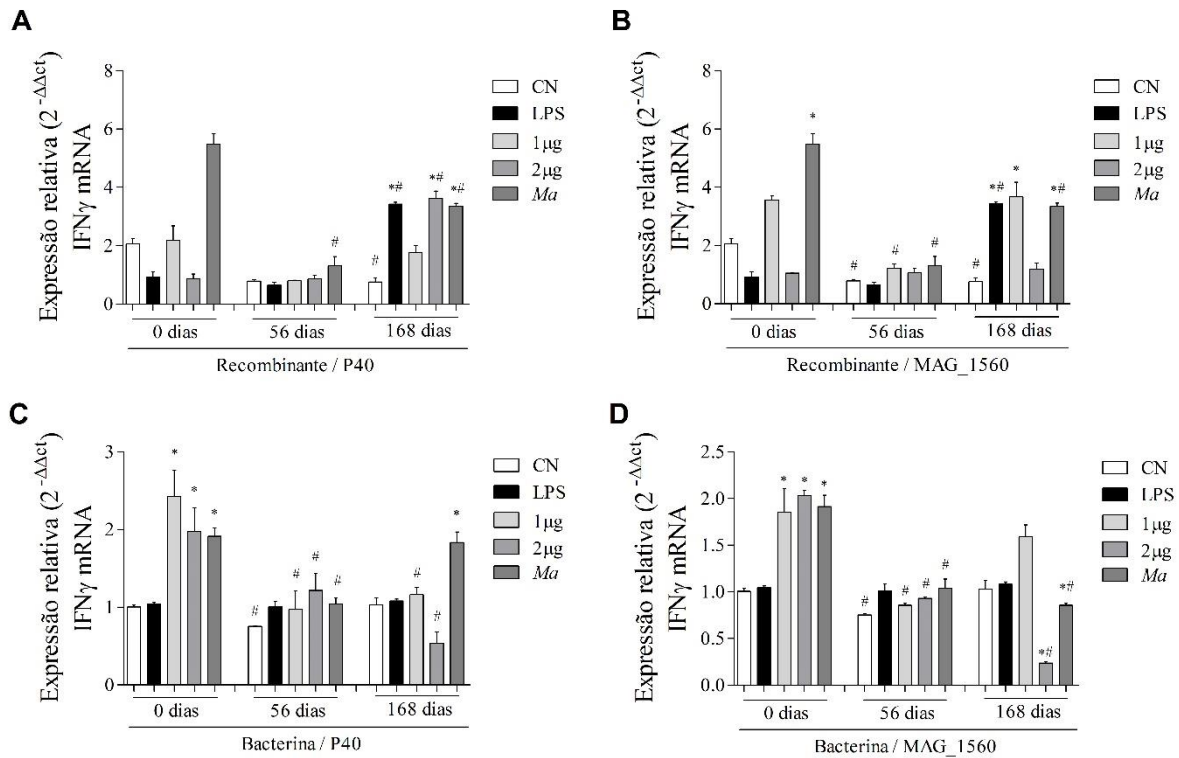


Fig. 4 Expressão gênica de IFN- γ de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo bacterina estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo bacterina estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

A expressão do gene IL-12 foi reduzida nos períodos pós imunização para o grupo recombinante em resposta a presença da P40 (Fig. 5A). Entretanto, 168 dias após, comparado ao controle negativo as células obtiveram indução na expressão da citocina. O grupo recombinante apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para MAG_1560 em comparação a pré-imunização somente com 56 dias após a imunização, com indução e redução da expressão com estímulo de 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Com 168 dias, o grupo bacterina apresentou indução da expressão de IL-12 com as duas proteínas (Fig. 5C e 5D) em ambas as

concentrações em comparação a resposta antes da imunização. Com 56 dias, a P40 em sua menor concentração foi capaz de induzir a expressão do gene IL-12 (Fig. 5C), enquanto a MAG_1560 reduziu a expressão (Fig. 5D).

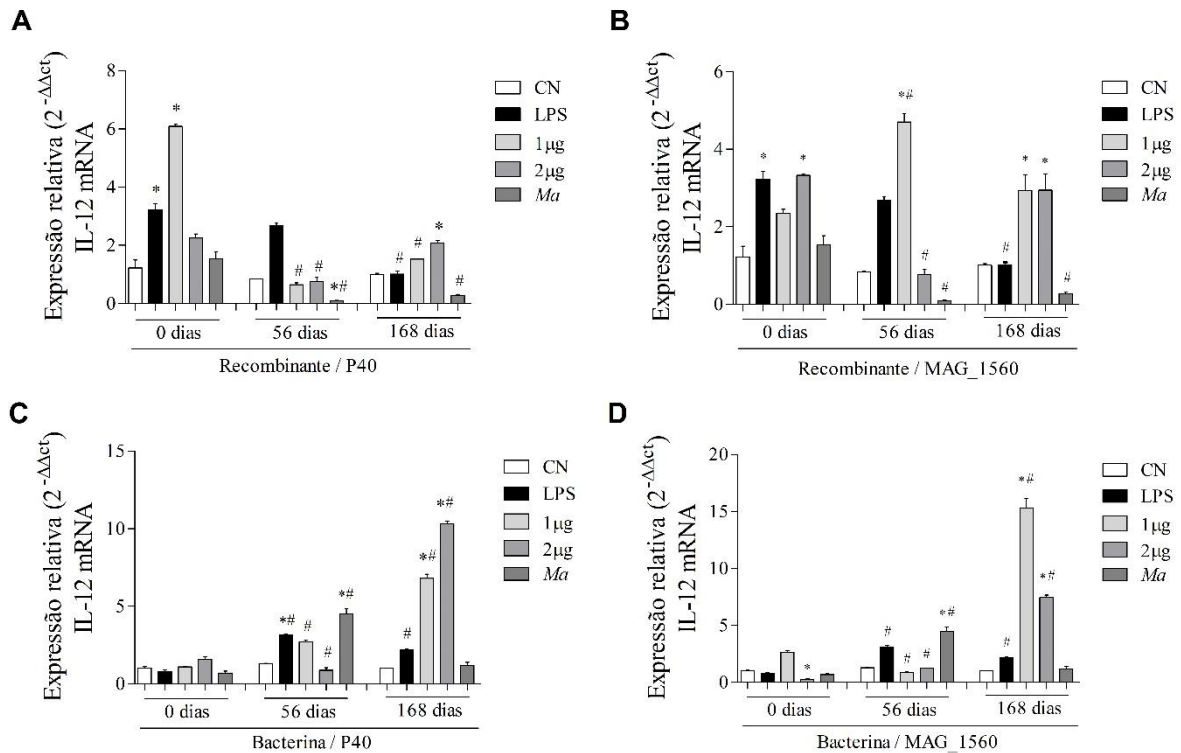


Fig. 5 Expressão gênica de IL-12 de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bactéria antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo bactéria estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo bactéria estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

A molécula encontrada em células apresentadoras de antígeno, MHC classe II, em resposta ao estímulo da proteína P40 no grupo recombinante (Fig. 6A) teve a expressão gênica induzida com 56 dias e redução estatisticamente significativa com 168 dias. A MAG_1560 (Fig. 6B) foi capaz de induzir a expressão do gene com a concentração mínima em 56 e 168 dias, mas a expressão foi reduzida com a concentração de 2 µg/ml no último tempo avaliado. O grupo

bacterina apresentou redução da expressão com 56 dias e indução e com 168 dias 1 µg/ml, e redução para os dois tempos com a maior concentração da P40 (Fig. 6C). A expressão das células em resposta a MAG_1560 (Fig. 6D) foi de redução da expressão com 56 dias e indução com 168 dias.

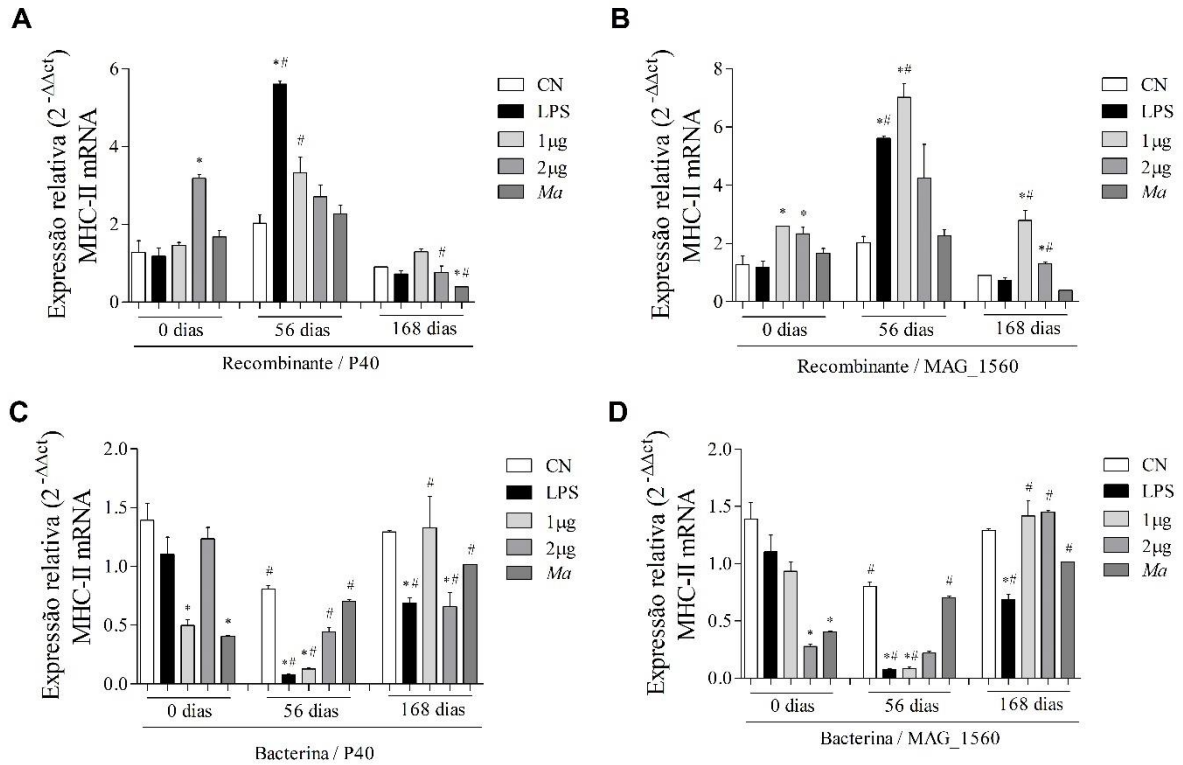


Fig. 6 Expressão gênica de MHC-II de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo bacterina estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo bacterina estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas medidas imunoproliféricas como alternativa as existentes, questionadas quanto a sua eficácia protetora e segurança, são um desafio no controle de *M.*

agalactiae. O micoplasma sendo o principal agente causador da agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes é responsável por uma alta morbidade acima da mortalidade nos animais, sendo associada a perdas econômicas em países da Europa ou no Brasil [7,37]. As atuais vacinas existentes licenciadas, atenuada e inativada, tendem a induzir titulações de anticorpos que diminuem rapidamente [38]. A utilização de proteínas antigênicas do microrganismo, como foco nas proteínas de membrana, são alvos a compor o novo modelo vacinal destinado a doença [20]. Neste estudo, a imunização de caprinos com duas proteínas recombinantes, P40 e MAG_1560, nos permitiu observar a evolução da resposta do sistema imune desenvolvida no período de 6 meses.

As proteínas de membrana possuem importante papel no desenvolvimento da infecção natural estabelecida pelo microrganismo, além de poder induzir resposta humoral por serem altamente imunogênicas [15,39]. A persistência de anticorpos específicos dos grupos imunizados e avaliados durante os 6 meses contra as proteínas recombinantes, extrato proteico total e proteínas de membrana de *M. agalactiae* foram evidenciados, demonstrando a eficiência da estratégia pela produção de altos níveis de anticorpos. Em um estudo, foi verificado que soros obtidos de animais naturalmente infectados com *M. agalactiae* apresentam reconhecimento de antígenos variáveis com anticorpos contra proteínas de membrana de 18 kDa a 80 kDa. Além disso, à medida que a infecção evolui, com 15 dias, há a identificação de anticorpos por outras proteínas acima de 32 kDa e sendo no trigésimo dia o reconhecimento de um maior número de proteínas imunogênicas [39]. Esses resultados possibilitam a compreensão do reconhecimento da MAG_1560 pelo grupo imunizado com o microrganismo inativado ocorrendo a partir de 21 dias de inoculação. No presente estudo, os níveis de anticorpos específicos para proteínas de membrana do micoplasma produzidos pela imunização com proteínas recombinantes e bacterina comparado ao grupo controle, exibiram aumento acima de cinco vezes na produção de anticorpos, enquanto, em outro estudo realizado com ovelhas imunizadas com *M. agalactiae* inativado emulsificado em adjuvante oleoso foi apresentado aumento de três vezes mais na produção. Nesse estudo citado, os animais apresentaram produção de anticorpos durante 5 meses e foi observada imunidade ao desafio com o microrganismo, sendo capaz de prevenir contra sinais clínicos relacionados a doença [40]. O período de persistência de anticorpos apresentado no estudo anterior se assemelha ao período em que houve presença contínua de anticorpos encontrados em maiores níveis em nossa análise, inclusive para a imunização com proteínas recombinantes, apontando assim resultados promissores para um possível desafio com o microrganismo após imunização com proteínas

recombinantes. Além disso, esses dados corroboram com a possibilidade da eficácia de vacinas recombinantes em comparação a vacinas inativadas, uma vez que a imunização com o microrganismo inativado, no estudo anterior, induziu a uma menor produção de anticorpos, em comparação ao nosso estudo, mas ainda assim foi capaz de prevenir sinais clínicos da doença.

É importante considerar que para eficácia de uma resposta imune modulada potente e duradoura de vacinas de subunidade, que são menos reagentes, é necessária a administração conjunta com adjuvantes potentes, considerando que o adjuvante vacinal utilizado está relacionado a aspectos dos anticorpos, como avidéz ou titulação [41,42]. Em um estudo com a proteína recombinante rP42, de choque térmico, os autores observaram que a formulação foi capaz de apresentar desenvolvimento de resposta humoral e celular em suínos quando administrada com adjuvante oleoso. Os autores verificaram a presença de anticorpos específicos para a proteína por mais de 84 dias após a imunização e anticorpos contra o extrato de *Mycoplasma hyopneumoniae* até 63 dias após a imunização [22]. Esse resultado com proteínas recombinantes, corrobora com o nosso estudo sendo identificados anticorpos contra o extrato total de *M. agalactiae* com 42, 128, 168 e 181 dias após a imunização. A produção de anticorpos também foi observada na aplicação de vacinas experimentais recombinantes com adjuvantes oleosos para outras micoplasmoses, como *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* responsáveis pela pleuropneumonia bovina contagiosa, mostrando que a proteção pode ser alcançada com proteínas recombinantes com redução dos sinais clínicos da doença [24]. Estudos com a utilização de proteínas recombinantes como forma de imunização contribuem para reforçar a aplicação desse modelo vacinal. Os dados aqui encontrados quanto a elevada produção de anticorpos proporcionada pela vacina recombinante, encaminha para uma alternativa as vacinas animais atuais existentes para a agalaxia contagiosa, proporcionando desenvolvimento da resposta imune eficaz e segura.

De uma forma geral, neste estudo, entre os grupos avaliados (recombinante e bacterina) foi observado um aumento gradativo na expressão do gene de IL-1B, sendo a expressão máxima observada com 168 dias. Com a ausência de parede celular nos micoplasmas, as proteínas de membrana, em maior abundância as lipoproteínas, desempenham papel importante na imunomodulação do sistema imunológico do hospedeiro [43]. Células mononucleares do sangue periférico quando estimuladas *in vitro* com micoplasma, como *M. bovis*, tendem a apresentar maior expressão de IL-1 β quando comparadas a células não estimuladas [44]. De forma similar, no nosso estudo foi possível observar essa resposta, com aumento da expressão de mRNA de IL-1 β em PBMC's de caprinos após da imunização. Membros da família da

interleucina-1, como IL-1 β , estão intimamente relacionados a resposta imune inata e no processo inflamatório [45]. Por outro lado, foi observado que a citocina IL-1 β pode contribuir na regulação das respostas imunes adaptativas sendo capaz de agir como “citocina de licenciamento” nas funções efetoras de todas as linhagens das células TCD4 de memória [46]. Essas células na reativação pela exposição ao antígeno podem ser protetoras através do aumento de resposta de células B, produzindo citocinas efetoras em grande quantidade no início da resposta ou de forma direta matando células infectadas [47]. Assim, o aumento na expressão de mRNA de IL-1 β de PBMC's em resposta a estimulação das proteínas recombinantes com o passar do tempo pode sugerir a possível atividade da citocina sob essas células de memória. A produção de IL-1 β também pode ser observada a partir da indução por proteínas de membrana associadas aos lipídeos do *Mycoplasma* (LAMPs), derivadas de *M. bovis*, em células embrionárias de pulmão bovino ativando a via NF-KB através da via TLR2 e MyD88 [31]. O mesmo pode ser observado para LAMPs de *M. gallisepticum* em linhagem celular de fibroblasto de embrião de galinha [48]. Células T reguladoras (T(reg)) devem ser superadas por células efetoras para o desenvolvimento de resposta imune apropriada a patógenos, sendo que, as citocinas IL-1 e IL-6, em conjunto, são mediadoras na resistência dessas células. A sinalização de receptores IL-1 via MyD88 são interações importantes para que células Th1 ultrapassem a atividade reguladora das células T(reg) e desenvolvam [49]. Em estudo avaliando a resposta imune humoral e celular de ovelhas imunizadas com vacinas atenuada de *Brucella melitensis*, foi observado resposta de células T(reg) predominante e duradora em PBMC's dos animais, sugerindo importante papel na redução da eficácia protetora da vacina administrada [50]. O aumento da expressão de mRNA de IL-1 β encontrado no presente estudo de animais imunizados em resposta a antígenos de *M. agalactiae* pode estar associada a supressão de células T(reg) contribuindo para o desenvolvimento de células efetoras na resposta imune provocada pela vacina.

A expressão de mRNA de IFN- γ dependente do tempo no grupo recombinante e bacterina em resposta a presença das proteínas recombinantes, na maior parte dos dados, não apresentou diferença na expressão ou produziu níveis mais baixos da citocina em comparação a antes da imunização. Em concordância ao que foi apresentado no nosso estudo, a análise *in vitro* de PBMC's de ovelhas infectadas expostas a *M. agalactiae* permitiu observar também a diminuição da expansão de células positivas para IFN- γ após 60 dias de infecção [51]. A presença de IFN- γ está relacionada a estimulação de macrófagos induzindo a mecanismos antimicrobianos, apresentação antigênica, maturação e diferenciação celular. Citocinas

secretadas por células apresentadoras de antígeno, como IL-12, controlam a produção de IFN- γ que pode ser regulada negativamente pela produção de citocinas como IL-4. [52] Sendo assim, pode ser secretado principalmente por linfócitos ativados, como, por exemplo, células T auxiliares CD4 tipo 1 e inibir a proliferação de células Th2, assim como a produção de IL-4 [53]. Uma vez que essa citocina pode ser regulada negativamente pela presença de IL-4, associada a perfil de células Th2, pode ser indicado aqui, em nosso estudo, a formação no início de um perfil de memória induzido pela resposta humoral nas células do grupo recombinante. Esse perfil de resposta pode ser associado ao encontrado em estudo com camundongos imunizados com *M. agalactiae* inativado emulsionado com FCA que, por sua vez, apresentaram produção de IgG específica ao microrganismo com ativação Th2 e secreção de IL-4 com co-secreção relativamente baixa de citocinas como IFN- γ e IL-12 [29]. É importante considerar que a produção de IFN- γ também pode estar associada ao desenvolvimento de células T auxiliares do tipo 2 a partir da alternância de isótipo de anticorpos [54,55]. Assim, os níveis maiores de mRNA de IFN- γ nos tempos iniciais encontrados no grupo bacterina pode ser relacionado a uma resposta celular inicial, mas também a resposta de perfil Th2. A identificação dos níveis de IFN- γ contribui para compreender o estabelecimento e desenvolvimento de ambos perfis de resposta ao longo do tempo e a sua contribuição para o desenvolvimento de resposta imune protetora.

A citocina IL-12, sendo produto principal de células como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, possui papel central na indução de resposta Th1. Sendo a sua produção fortemente induzida pela presença de produtos microbianos, dentre seus papéis biológicos, a IL-12 está intimamente relacionada a indução da produção de IFN- γ . [56] Essa correlação sinérgica foi observada no grupo recombinante que em 168 dias em comparação ao controle negativo de células não estimuladas, apresentou aumento significativo na expressão de mRNA de IL-12 e IFN- γ . De forma similar, o aumento de ambas citocinas pode ser observado em células mononucleares do baço de camundongos imunizados com vacina de DNA da proteína P48 de *M. agalactiae* [57]. O grupo bacterina em resposta ao estímulo de ambas proteínas, com o passar do tempo apresentou aumento na expressão de mRNA de IL-12. Em resposta a reincidência na exposição das proteínas recombinantes antigênicas em período de 2 horas de cultura, os PBMC's caprinos imunizados, em nosso estudo, aparentemente produziram uma resposta mais rápida com maiores níveis de expressão de IL-12. O desenvolvimento dessa resposta rápida pode estar associado a um perfil de memória proporcionado pela imunização com bacterina impulsionado em resposta as proteínas recombinantes (P40 e MAG_1560) aqui

utilizadas. A resposta de células T de memória, capazes de modular a resposta imunológica de memória, quando expostas ao antígeno, diferindo de células T naïve, possuem a capacidade de produção imediata de citocinas associada a capacidade de recordação rápida para o combate de patógenos [58]. A vacinação em ovinos, independente do modelo de vacinas existentes, contra *M. agalactiae* é capaz de induzir resposta humoral e celular [59].

Iniciando uma resposta imune adaptativa a com especificidade de patógenos, as moléculas de MHC possuem como função central a apresentação de antígenos peptídicos que são processados e apresentados à células T [60]. A classe II de moléculas de MHC desenvolve papel essencial na iniciação de apresentação de antígenos a linfócitos TCD4, estando a sua expressão associada a células apresentadoras de antígenos (APCs), que incluem, macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B [61]. Após a imunização, as células mononucleares dos grupos recombinante e bacterina, com 56 e 168 dias, respectivamente, apresentaram aumento na expressão de mRNA para MHC-II comparado a células sem contato anterior com o antígeno (proteínas recombinantes). Células T de memória por intermédio do reconhecimento de antígeno através de MHC possuem a capacidade de desenvolver uma resposta de recordação potente e aprimorada, sendo isto, um fator crítico para imunidade a longo prazo [62]. Células B também são capazes de expressar em sua superfície moléculas MHC-II, estabelecendo assim contato com células TCD4, através do complexo peptídeo-MHC-II, que contribuem para a sua proliferação e diferenciação [61]. O aumento da expressão da molécula sugere o reconhecimento do sistema imune as proteínas, seja por células T ou B, que é responsável por sequencialmente orquestrar a resposta a ser desenvolvida. Em estudo realizado avaliando a imuno-histoquímica de lesões pulmonares infeccionadas por *M. agalactiae* e *M. bovis* em cabras, foi observado aumento de células mononucleares expressando MHC classe II, sugerindo participação da sinalização da apresentação de antígenos as células por intermédio de resposta celular ou humoral [63]. É importante considerar que as citocinas possuem papel fundamental regulando positivamente MHC de células como macrófagos o que contribuem para o início e desenvolvimento de resposta imune, uma vez que há o reconhecimento através dessas moléculas do antígeno por células T [63,64].

Dessa forma, o presente estudo demonstrou que os grupos imunizados, com proteína recombinante e bacterina, foram capazes de gerar elevada produção de anticorpos durante o período de 6 meses, além de ter apresentado responsividade sorológica de reconhecimento ao extrato total e a porção de proteínas de membrana. Foi possível constatar também responsividade de PBMC's ao longo do tempo ao estímulo gerado pelas proteínas, sendo

possível observar, principalmente o aumento na expressão de mRNA da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Foi apresentada a presença de apresentação antigênica e através das outras citocinas, IFN- γ e IL-12, deduzir sobre a ambiguidade do perfil de resposta presente (celular e humoral). Entretanto, para maior elucidação e complementariedade da resposta formada visa-se necessário a avaliação do papel de outras citocinas e outros mecanismos de resposta estimulados. Os dados aqui apresentados apontam um caminho promissor na formulação de vacina recombinante como alternativa as existentes para agalaxia contagiosa além de contribuir para a compreensão da imunomodulação para obtenção de imunidade proporcionada por proteínas de membrana de *M. agalactiae*.

REFERÊNCIAS

INTRODUÇÃO

A agalaxia contagiosa (AC) é uma doença que atinge caprinos e ovinos conhecida desde 1816 quando foi relatada pela primeira vez na Itália. Entretanto, a sua natureza contagiosa só veio a ser notada anos mais tarde, ao ser observado que animais que pastavam em local após um rebanho infectado, acabava sendo afetado [1]. Sendo *M. agalactiae* o agente clássico da doença, esta pode ser ocasionada por outras três espécies micoplasmáticas, como: *Mycoplasma capricolum* subespécie *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* “large colony type” (*MmmLC*) e *Mycoplasma putrefaciens* (*Mp*) [2].

As vias mais comuns que o micoplasma pode adentrar no organismo do hospedeiro, são oral, respiratória ou mamária. Assim, é carregado através da circulação sanguínea se estabelecendo em outros órgãos do sistema onde desenvolvem uma resposta inflamatória como nas glândulas mamárias, olhos, articulações e linfonodos. Com isso, além de desenvolver bacteremia acompanhada por febre, sintomas como hipoagalaxia transitória à agalaxia abrupta e total, mastite, artrite, poliartrite, ceratoconjuntivite podem ocorrer [3,4]. Abortos podem acontecer em fêmeas grávidas quando alterações nos órgãos genitais são observadas assim como a inflamação do útero [5]. Antibióticos são utilizados como medidas terapêuticas. Em contrapartida, é necessária a aplicação de uma dose terapêutica definida e por um período suficientemente longo, caso contrário, o efeito da antibioticoterapia pode ser reduzido ou nenhum com conseqüente disseminação dos agentes da doença no ambiente e possibilidade de desenvolvimento de estirpes resistentes [2–4].

As alternativas vacinais existentes para a doença baseiam-se na aplicação de vacinas inativadas ou atenuadas. Na região sul da Europa, vacinas comerciais inativadas por formalina direcionadas a *M. agalactiae* são mais utilizadas, enquanto na Turquia há a prevalência da aplicação de vacinas atenuadas [6]. No Brasil, ainda que a agalaxia contagiosa ocasionada por *Ma* tenha sido registrada no país [7–10] no mercado não há disponibilidade de vacinas e nenhuma legislação quanto a seu uso [11]. A aplicação das vacinas inativadas tendem a ser repetidas em períodos mais curtos, uma vez que a estimulação de anticorpos possui menor titulação e são menos persistentes [12]. Esse modelo de vacina inativada monovalente, reduz os sinais clínicos da agalaxia contagiosa, em contrapartida, não é sempre que é capaz de garantir completa prevenção contra o microrganismo [13]. Com a utilização das vacinas atenuadas as lesões articulares desaparecem, entretanto os animais através da lactação, apesar desta ser retomada a normalidade, continuam excretando o patógeno por vários meses. Em animais

saudáveis que são vacinados como medida de prevenção, a infecção generalizada e o desenvolvimento de sinais clínicos não ocorrem, mas pode apresentar infecção temporária no úbere [4].

Apesar dos mecanismos de persistência e infecção do *M. agalactiae* serem desconhecidos, há conhecimento limitado relacionado a sua diversidade antigênica de superfície que contribuem para sua patogenicidade, incluindo lipoproteínas de superfície imunodominantes com frequente alternância, que são as Vpmas (proteínas variáveis de *M. agalactiae*) [14], P40 [15], P48 [16], P80 [17,18], MAG_1000, MAG_1980, MAG_2220, MAG_4740, MAG_2430, phnD [19], MAG_1560 e MAG_6130 [20]. A identificação e caracterização de proteínas imunogênicas, possibilita o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e profilaxia contra a agalaxia contagiosa. No mesmo segmento que para outras micoplasmoses animais, estudos apresentam proteínas recombinantes com perfil antigênico e imunogênico para a possível composição de vacinas de subunidades, como para *M. hyopneumoniae* [21–23], *M. mycoides* subespécie *mycoides* [24,25], *M. ovipneumoniae* [26,27], *M. haemofelis* [28].

Duas lipoproteínas antigênicas de micoplasma (MAG_1560 e MAG_6130) identificadas e caracterizadas anteriormente no nosso grupo de pesquisa e a P40 [15] foram avaliadas quanto a sua antigenicidade, sendo reconhecidas por soros testados de caprinos e ovinos naturalmente infectados por *M. agalactiae* e apresentando potencial imunogênico com produção de anticorpos IgG em coelhos [20]. Dessa forma, esse estudo objetiva analisar a resposta imune em modelo caprino das proteínas MAG_1560 e P40 como potencial para a formulação de uma vacina recombinante para agalaxia contagiosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Expressão e purificação das proteínas recombinantes P40 e MAG_1560

Nesse estudo, foram utilizadas duas proteínas antigênicas recombinantes de *Mycoplasma agalactiae*, a P40 (42 KDa) [15] e MAG_1560 (32 KDa) [20]. Para a expressão proteica, foi realizado um pré-inóculo em meio LB (Luria-Bertani) contendo canamicina utilizando a cepa de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® transformadas contendo o vetor de interesse e incubados *overnight* em rotação a 37°C. Posteriormente, o pré-inóculo foi transferido para um volume maior e incubado durante 3 horas, até atingir a densidade óptica de 1.0 a 1.5 a 600 nm. A expressão proteica então foi induzida com 1 mM de IPTG incubado

novamente em agitação a 17°C *overnight*. As células foram obtidas a partir da centrifugação e o *pellet* foi homogeneizado em tampão tris-salina (Tris NaCl; 0,1M Tris, 0,5M NaCl, 10% glicerol, pH 8,5) com inibidor de proteases e lisadas por sonicação. A amostra após ser lisada foi centrifugada e o sobrenadante contendo as proteínas de interesse foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm. A solução filtrada então purificada em coluna contendo resina quelante de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA) com diferentes concentrações de imidazol. As proteínas foram visualizadas através de SDS-PAGE, confirmadas através de *Western blot* e realizada a diálise para remoção de imidazol residual. Assim, foram concentradas e quantificadas através da metodologia de Bradford com leitura em placa a 595 nm.

Inativação de *Mycoplasma agalactiae*

O isolado GM-139 de *M. agalactiae* foi cultivado durante 48h a 37°C em meio SP4 suplementado. O cultivo foi centrifugado e o sedimento foi ressuscitado em PBS. Foi realizada a diluição seriada da cultura com plaqueamento para determinar a CFU/ml. Com a obtenção do microrganismo, a amostra foi inativada com incubação a 37°C durante 16h com formaldeído a 0,5% [29]. Após o período, as células foram centrifugadas e ressuscitadas em Tris-salina após a lavagem. Antes da inativação do microrganismo foi determinada a concentração de proteínas, usando soro albumina bovina (BSA) como padrão, através do método BCA com o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Extração de proteína de membrana

Com base na metodologia de Rawadi e Roman-Roman [30] com modificações foram extraídas as proteínas de membrana do *M. agalactiae* por meio da separação de fases com o detergente não-iônico Triton X-114 (TX-114). A bactéria foi cultivada e o sedimento de células formado após a centrifugação e houve remoção do meio de cultura do cultivo foi utilizado para a extração. A solução celular foi ressuscitada em Tris-EDTA (50mM Tris pH 8,0, 0.15M NaCL, 1mM EDTA) contendo 2% de TX-114 e incubadas durante 3 horas a 4°C. Posteriormente, foi incubado durante 30 minutos a 37°C para separação de fases, centrifugado e incubado em gelo por 5 minutos. Esse último processo, para remoção de proteínas de fase aquosa da porção TX, foi repetido três vezes com adição de tampão Tris-EDTA sem o detergente. À fase TX final foi adicionado o tampão Tris-EDTA e para precipitação das

proteínas de membrana foi adicionado 2,5 vezes do volume de etanol absoluto com incubação *overnight* a -20°C. Após a centrifugação o precipitado foi recuperado e ressuspendido em PBS. A concentração de proteínas de membrana obtida foi quantificada através do método de Bradford.

Imunização dos animais e grupos experimentais

Foram preparadas duas diferentes soluções imunizantes. A vacina A teve em sua composição 100 µg de proteína recombinante no total (50 µg de MAG_1560 + 50 µg de P40) em 1 mL. Para a formulação da vacina B, correspondente ao imunizante bacterina, foi adicionado 1 mL de *M. agalactiae* inativado a 10⁹ CFU/ml. Com volume final de solução de inoculação de 2 mL, na primeira imunização as vacinas A e B foram homogeneizadas com a adição de 1ml de adjuvante completo de Freund's (1:1) e na segunda dose, foi utilizada a mesma formulação, entretanto foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund's (1:1).

Para realizar a imunização, foram utilizadas fêmeas caprinas da raça Boer (n=12) com 5 meses de idade. A utilização dos animais foi aprovada pelo Conselho de ética de Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira (protocolo 077/2019). Os animais foram examinados e avaliados quanto a presença de *Mollicutes* e *M. agalactiae*. Foram utilizados no experimento aqueles considerados negativo para *Ma*. As cabras foram divididas em três grupos (n=4): (I) controle negativo, inoculados com tampão Tris-salina mais adjuvante de Freund's completo ou incompleto; (II) grupo recombinante inoculados com a vacina A; (III) grupo bacterina inoculado com a vacina B. A imunização foi realizada através da via subcutânea. Após 28 dias, os grupos receberam reforço de dose (tris-salina, proteína recombinante ou bacterina).

Os animais foram avaliados durante 6 meses através da coleta de sangue, em tubos estéreis com e sem EDTA, de cada cabra por venipunção da jugular externa. A primeira coleta foi realizada antes das inoculações (tempo zero) e 7, 14, 21, 42, 56, 70, 91, 104, 128, 168 e 181 dias após a inoculação dos imunógenos.

Determinação dos níveis de produção de IgG específica por ELISA indireto

Através do ensaio indireto de ELISA foi determinada a produção de anticorpos formada em resposta as proteínas ou bacterina. A técnica foi anteriormente padronizada quanto a utilização de antígeno. Poços de microplacas foram sensibilizados com extrato proteico total de *M. agalactiae* (1 µg/poço em tampão carbonato-bicarbonato) obtido a partir da lise com tampão

RIPA, proteína recombinante P40 ou MAG_1560 (50 ng/poço em tampão carbonato-bicarbonato) ou com proteínas de membrana de *Ma*, sendo incubadas a 4°C por 16 horas. As placas foram bloqueadas com PBS 0,05% Tween-20 (PBS-T) contendo 10% de leite desnatado. Os soros coletados dos animais de cada grupo foram diluídos (1:200) em PBS-T contendo 5% de leite desnatado e incubadas. Posteriormente os poços foram lavados com PBS-T e o anticorpo secundário anti-IgG de caprino diluído (1:2000) em PBS-T contendo 5% de leite desnatado foi adicionado. As placas foram incubadas e em seguida a revelação foi conduzida com o o-fenilendiamina dicloridrato (OPD) com interrupção pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura foi realizada a 490 nm em leitor de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader).

Análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios desencadeada pela estimulação *in vitro* de células sanguíneas do sangue periférico (PBMC)

Foi realizado a análise comparativa da resposta de marcadores inflamatórios (IL-1β, IFNγ, IL-12 e para a molécula de complexo de histocompatibilidade MHC-II) em células sanguíneas do sangue periférico obtidas dos animais antes das inoculações (tempo zero) e com 56 e 168 dias. As PBMC dos grupos vacinais foram isoladas para a estimulação das células *in vitro* dos caprinos com o período de 2 horas [30]. Foram utilizados 5 mL de sangue periférico de cada animal. O isolamento foi realizado utilizando o Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich). As células mononucleares de cada animal foram coletadas e formado *pooled* de PBMC do grupo experimental. Após as lavagens, ao sedimento de células foi adicionado meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100U/ml de penicilina para ressuspensão. O processo prosseguiu com a contagem de células em câmara de Neubauer utilizando Azul de Tripán. O volume celular foi ajustado para concentração de 2x10⁵ células/ml e em seguida o *pooled* de células foi adicionado em triplicata em placa de 24 poços. As células foram estimuladas com o *M. agalactiae* inativado com 10⁵ CFU/mL e com as proteínas P40 e MAG_1560 separadamente nas concentrações de 1 e 2µg/ml. Ao controle negativo foi adicionado Tris-salina e como controle positivo foi utilizado LPS. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 2 horas. As células em suspensão foram obtidas a partir da centrifugação do sobrenadante e as células aderidas a placa foram removidas com tripsina. As células obtidas foram armazenadas em RNAlater™.

Extração de RNA, síntese de cDNA e expressão gênica

A extração do RNA foi realizada com TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante e purificado através do PureLink™ RNA Mini Kit. A partir do RNAm extraído foi realizada a síntese em cDNA utilizando o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase™ (Invitrogen – Thermo Fisher). Foi analisada a expressão gênica da molécula de complexo de histocompatibilidade MHC-II [31] e de citocinas IL-1β [32], IFNγ [33], IL-12 [34]. Como controle endógeno foi utilizado β-actina [35]. As reações de RT-qPCR foram realizadas na plataforma StepOnePlus PCR Real Time System (Applied Biosystems™) com o Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™). A análise dos dados foi obtida através do método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do GraphPad-Prism 5.0 utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para diferenciação dos grupos de ELISA. Para análise de expressão gênica foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação de dois grupos. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%. Os valores foram apresentados como médias e erro padrão da média.

RESULTADOS

Purificação das proteínas

As proteínas P40 e MAG_1560 foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli* purificadas por cromatografia de afinidade com resina de níquel e o resultado da purificação pode ser visualizado em Western Blot (Fig. 1).

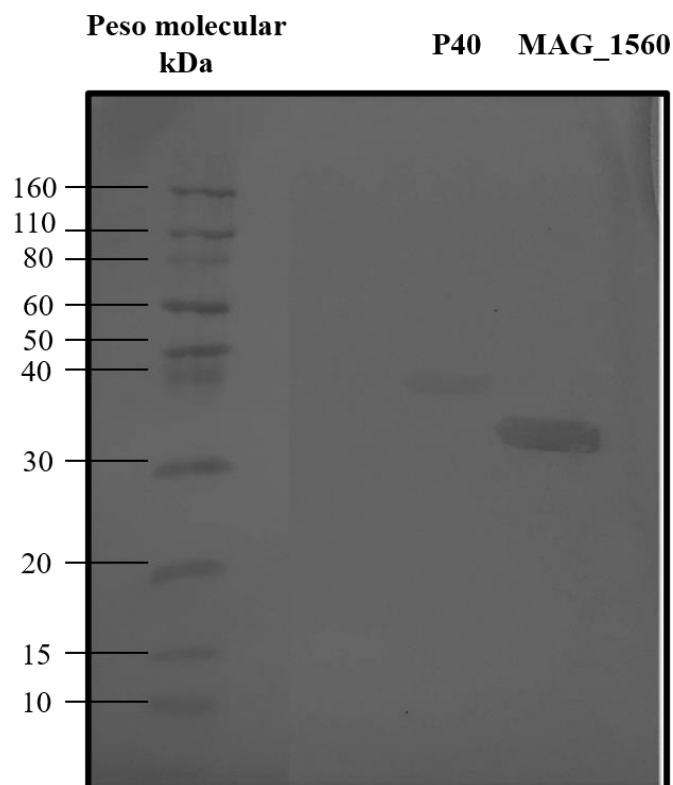


Fig. 7. Proteínas recombinantes purificadas visualizadas em Western Blot. Coluna 1: Peso molecular Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard; Coluna 2: P40 (42KDa); Coluna 3: MAG_1560 (32 KDa).

A vacina recombinante induziu alta taxa de produção de anticorpos IgG específicos

A produção de anticorpos IgG específicos por cada grupo foi avaliada durante o período de 181 dias em resposta as proteínas recombinantes inoculadas (P40 e MAG_1560), ao extrato proteico total e as proteínas de membrana de *Ma*. No grupo recombinante o sistema imune dos animais foi capaz de gerar uma elevada produção de anticorpos para ambas as proteínas inoculadas (Fig. 2A e 2B) que perdurou durante todo o período de análise apresentando capacidade imunogênica. O grupo imunizado com bacterina (Fig. 2B) teve produção de anticorpos específicos para a proteína MAG_1560 apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do grupo controle imunizado somente com o tampão e adjuvante. Em resposta ao extrato proteico total de *Ma* (Fig. 2C), o grupo bacterina apresentou alta produção de anticorpos. Apesar de valores baixos apresentados do grupo recombinante em resposta ao extrato proteico total, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo recombinante e controle com 42, 128, 168 e 181 dias após a imunização. O soro de ambos os grupos, recombinante e bacterina, apresentaram produção de anticorpos durante os 181 dias em resposta as proteínas de membrana do *M. agalactiae*.

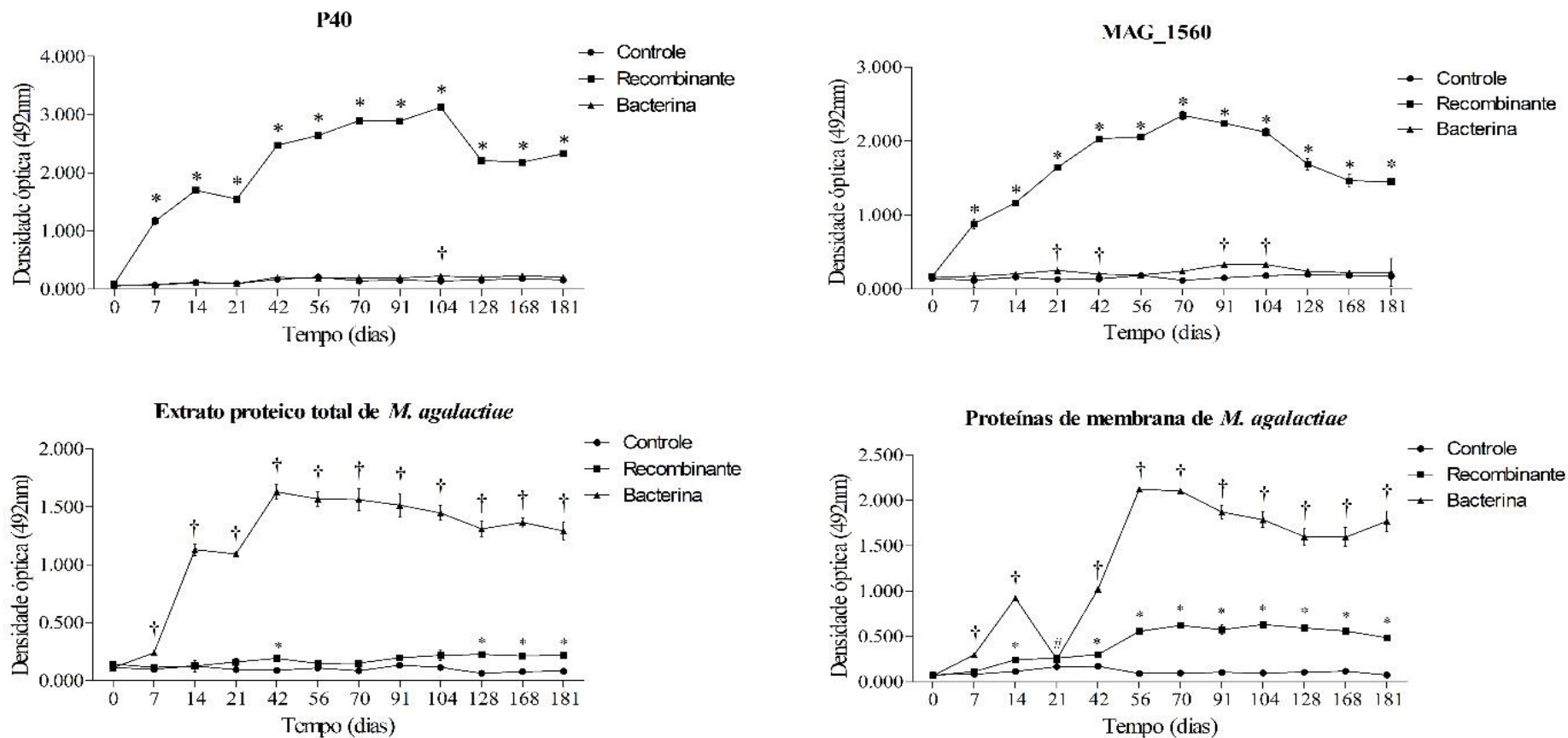


Fig. 8. ELISA indireto do soro de animais inoculados (controle, proteínas recombinantes e bacterina). (A) Produção de anticorpos em resposta a P40. (B) Produção de anticorpos em resposta a MAG_1560. (C) Produção de anticorpos em resposta ao extrato proteico total de *M. agalactiae*. (D) Produção de anticorpos em resposta as proteínas de membrana de *M. agalactiae*. Os grupos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A significância estatística ($p < 0,05$) é representada pelos símbolos quando (#) diferente do grupo controle, (*) diferente do grupo controle e bacterina e (†) diferente do grupo controle e recombinante.

As proteínas P40 e MAG_1560 são capazes alterar a expressão gênica de citocinas e MHC-II nos diferentes grupos

A avaliação da expressão gênica das células mononucleares do sangue periférico isoladas dos animais foi avaliada antes da inoculação (0 dias), 56 dias e 168 dias após a imunização com estímulo *in vitro* em cultura de células com 2 horas de incubação com as proteínas P40 e MAG_1560. As células do grupo imunizado com proteínas recombinantes e com bacterina em resposta ao estímulo pela P40 em diferentes concentrações apresentaram aumento estatisticamente significativo na expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Fig. 3A e 3C) em 56 e 168 dias após a inoculação em comparação a antes da imunização. O aumento da expressão ocorreu também para o grupo bacterina em resposta a P40 com 56 e 168 dias em relação ao controle negativo, com exceção da concentração 2 μ g/ml que não apresentou diferença estatisticamente significativa com 56 dias. Em resposta a MAG_1560, o grupo recombinante apresentou aumento significativo para a concentração de 1 μ g/ml nos tempos após a inoculação para o gene IL-1 β (Fig. 3B). Enquanto o grupo bacterina apresentou aumento da expressão de IL-1 β para ambas as concentrações de MAG_1560 (Fig. 3D).

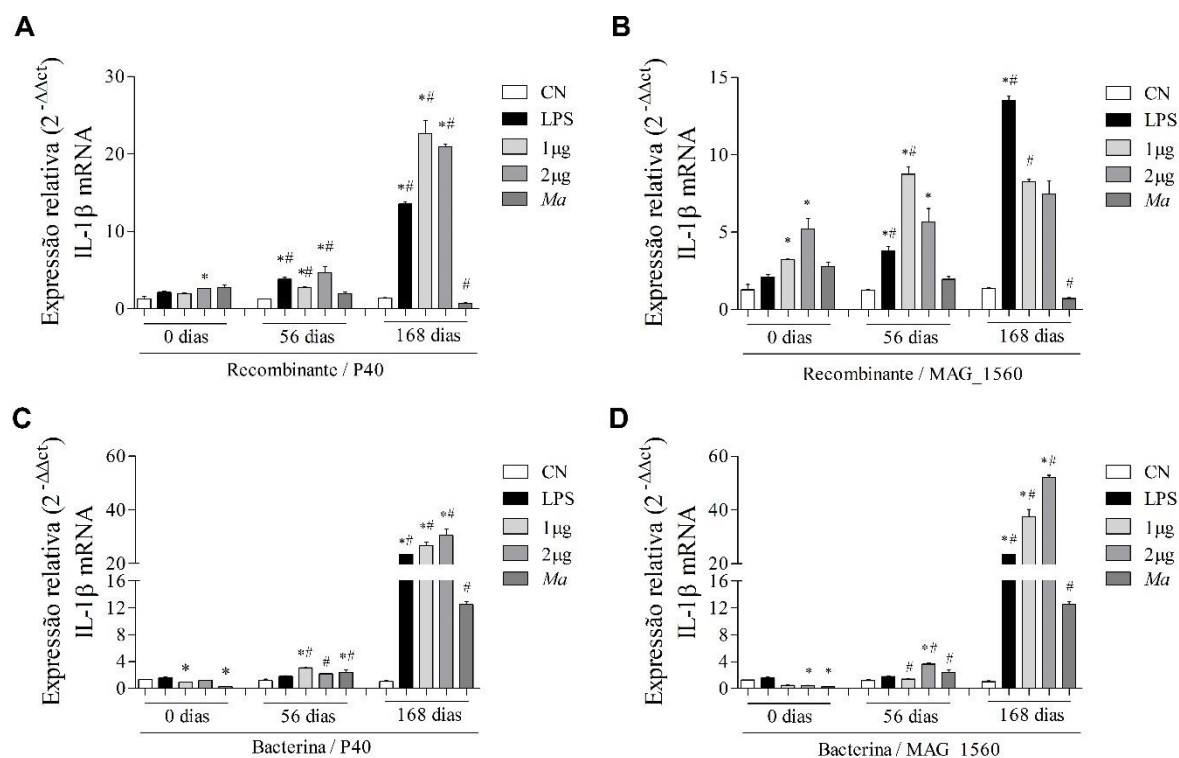


Fig. 9 Expressão gênica de IL-1 β de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bactéria antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo bactéria estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de IL-1 β em células do grupo bactéria estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

Em relação a expressão de IFN- γ , a proteína P40 também induziu o aumento da expressão do gene com estímulo a maior concentração da proteína (2 μ g/ml) das células do grupo recombinante com 168 dias (Fig. 4A). Em resposta a MAG_1560, com 56 dias, o grupo recombinante apresentou redução da expressão gênica com diferença estatisticamente significativa para a concentração de 1 μ g da proteína. Não foi apresentada diferença com 168 dias para ambas as concentrações da proteína MAG_1560. O grupo imunizado com bacterina, em comparação a antes da inoculação, apresentou com 56 dias baixa expressão para ambas as proteínas nas diferentes concentrações (Fig. 4C e 4D). Com 168 dias após a inoculação o grupo bacterina em resposta ao estímulo da P40 (Fig. 4C) apresentou baixa expressão do gene IFN- γ para as concentrações de 1 e 2 μ g/ml e para 2 ug/ml de MAG_1560 (Fig. 4D).

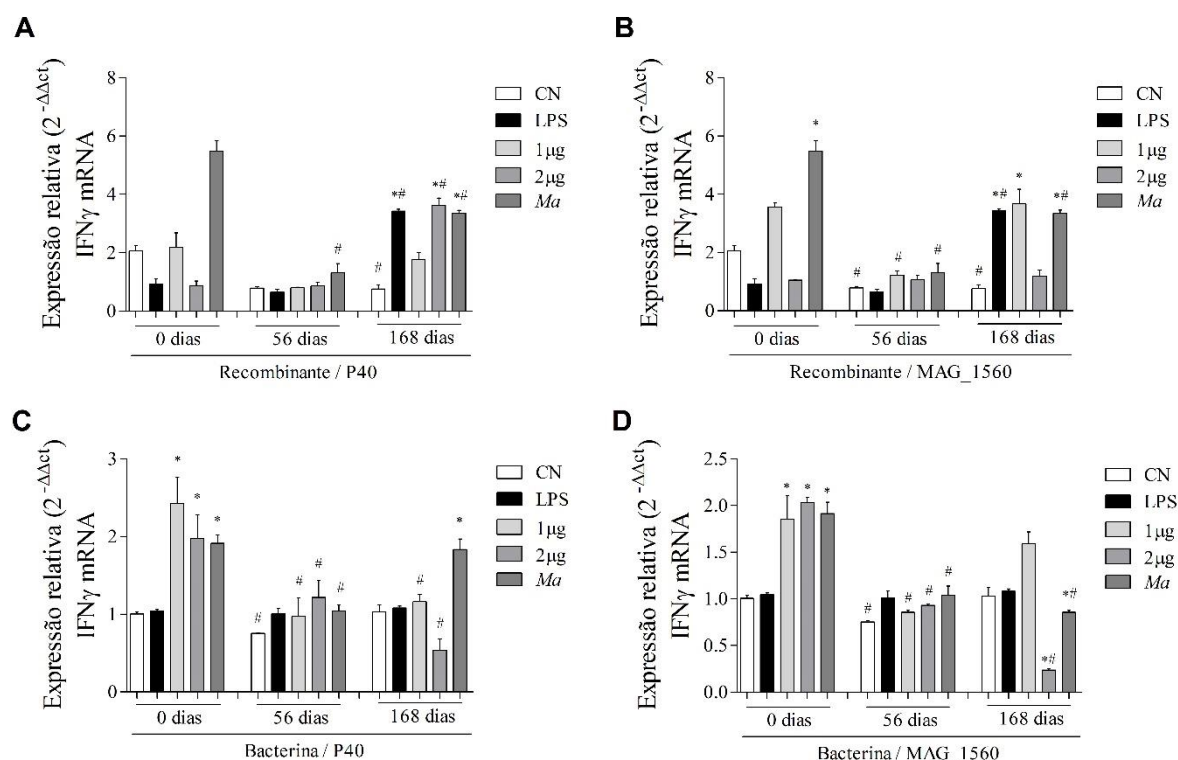


Fig. 10 Expressão gênica de IFN- γ de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo bacterina estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de IFN- γ em células do grupo bacterina estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

A expressão do gene IL-12 foi reduzida nos períodos pós imunização para o grupo recombinante em resposta a presença da P40 (Fig. 5A). Entretanto, 168 dias após, comparado ao controle negativo as células obtiveram indução na expressão da citocina. O grupo recombinante apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para MAG_1560 em comparação a pré-imunização somente com 56 dias após a imunização, com indução e redução da expressão com estímulo de 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Com 168 dias, o grupo bacterina apresentou indução da expressão de IL-12 com as duas proteínas (Fig. 5C e 5D) em ambas as

concentrações em comparação a resposta antes da imunização. Com 56 dias, a P40 em sua menor concentração foi capaz de induzir a expressão do gene IL-12 (Fig. 5C), enquanto a MAG_1560 reduziu a expressão (Fig. 5D).

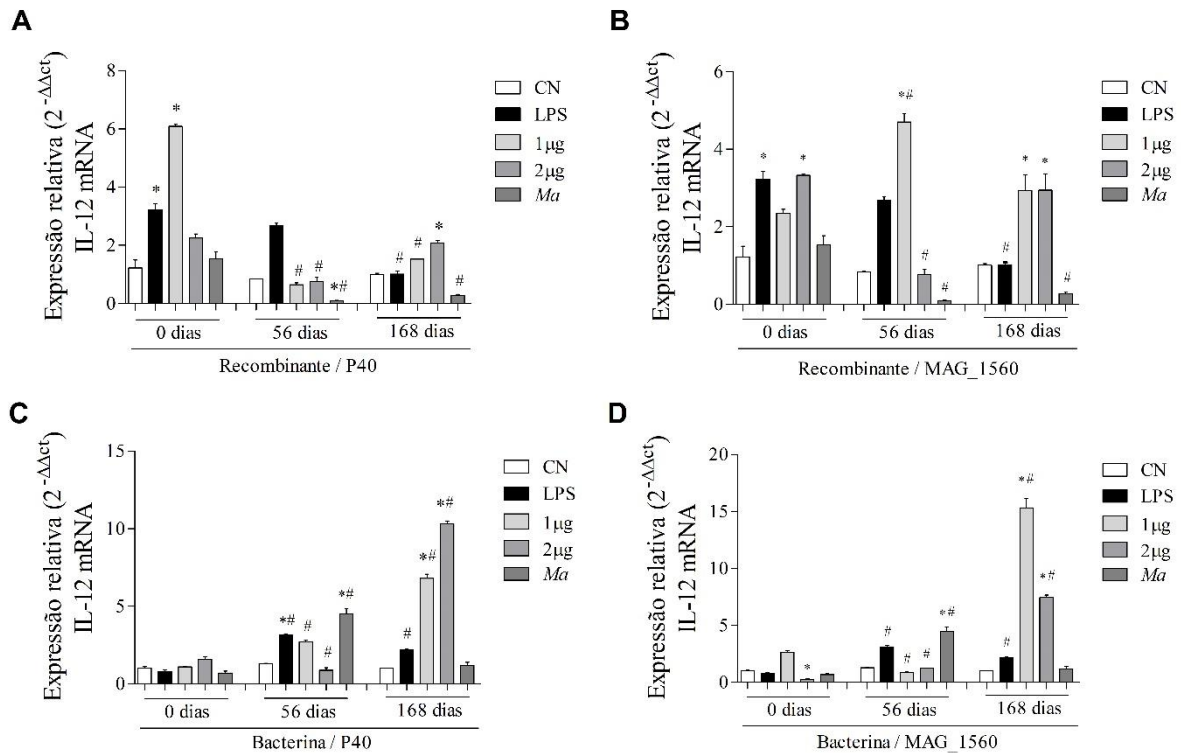


Fig. 11 Expressão gênica de IL-12 de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bactéria antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo bactéria estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de IL-12 em células do grupo bactéria estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

A molécula encontrada em células apresentadoras de antígeno, MHC classe II, em resposta ao estímulo da proteína P40 no grupo recombinante (Fig. 6A) teve a expressão gênica induzida com 56 dias e redução estatisticamente significativa com 168 dias. A MAG_1560 (Fig. 6B) foi capaz de induzir a expressão do gene com a concentração mínima em 56 e 168 dias, mas a expressão foi reduzida com a concentração de 2 µg/ml no último tempo avaliado. O grupo

bacterina apresentou redução da expressão com 56 dias e indução e com 168 dias 1 µg/ml, e redução para os dois tempos com a maior concentração da P40 (Fig. 6C). A expressão das células em resposta a MAG_1560 (Fig. 6D) foi de redução da expressão com 56 dias e indução com 168 dias.

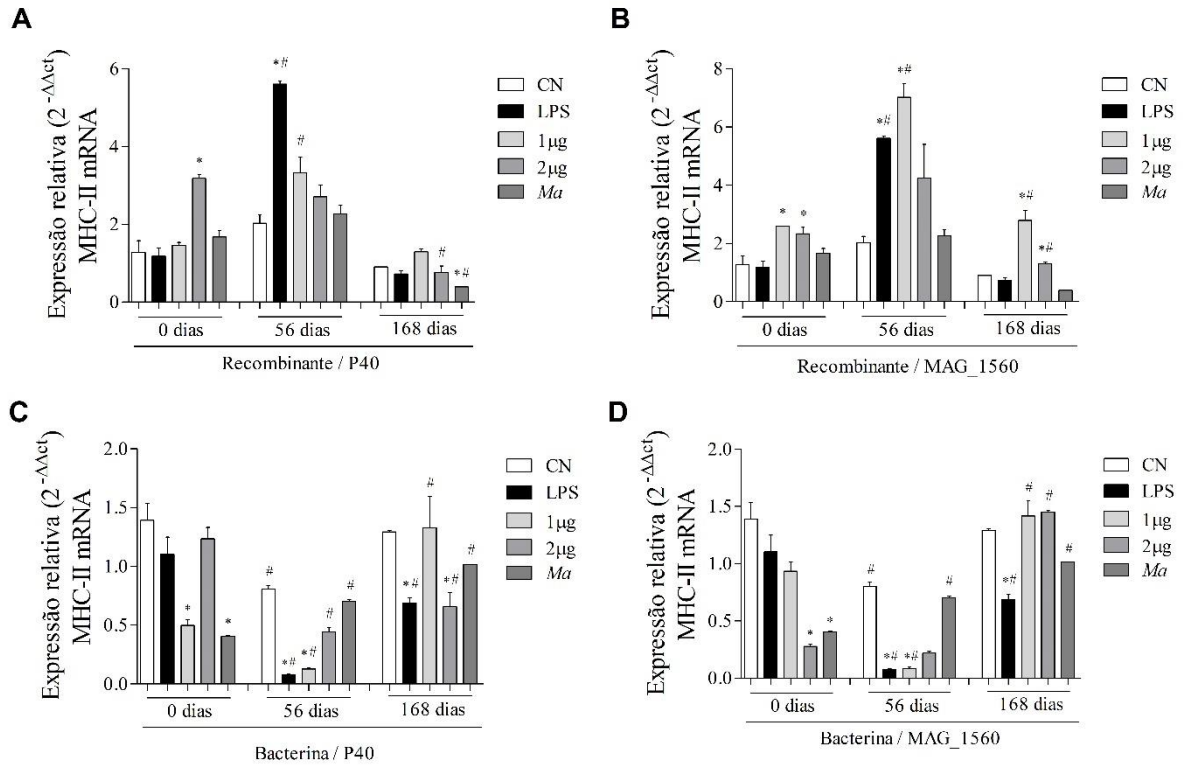


Fig. 12 Expressão gênica de MHC-II de PBMCs isolados de caprinos após a imunização com proteínas recombinantes e bacterina antes da inoculação, 56 e 168 dias após incubadas durante 2 horas com proteína recombinante P40 e MAG_1560. (A) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo recombinante estimuladas com P40. (B) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo recombinante estimuladas com MAG_1560. (C) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo bacterina estimuladas com P40. (D) Expressão gênica de MHC-II em células do grupo bacterina estimuladas com MAG_1560. Quando comparados os estímulos entre os tempos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (#) quando diferente do grupo respectivo no tempo antes da inoculação (0 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi utilizado para comparação com o controle negativo dentro do tempo (0, 56 ou 168 dias). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são representadas por (*) quando diferente do respectivo controle negativo.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas medidas imunoproliféricas como alternativa as existentes, questionadas quanto a sua eficácia protetora e segurança, são um desafio no controle de *M.*

agalactiae. O micoplasma sendo o principal agente causador da agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes é responsável por uma alta morbidade acima da mortalidade nos animais, sendo associada a perdas econômicas em países da Europa ou no Brasil [7,37]. As atuais vacinas existentes licenciadas, atenuada e inativada, tendem a induzir titulações de anticorpos que diminuem rapidamente [38]. A utilização de proteínas antigênicas do microrganismo, como foco nas proteínas de membrana, são alvos a compor o novo modelo vacinal destinado a doença [20]. Neste estudo, a imunização de caprinos com duas proteínas recombinantes, P40 e MAG_1560, nos permitiu observar a evolução da resposta do sistema imune desenvolvida no período de 6 meses.

As proteínas de membrana possuem importante papel no desenvolvimento da infecção natural estabelecida pelo microrganismo, além de poder induzir resposta humoral por serem altamente imunogênicas [15,39]. A persistência de anticorpos específicos dos grupos imunizados e avaliados durante os 6 meses contra as proteínas recombinantes, extrato proteico total e proteínas de membrana de *M. agalactiae* foram evidenciados, demonstrando a eficiência da estratégia pela produção de altos níveis de anticorpos. Em um estudo, foi verificado que soros obtidos de animais naturalmente infectados com *M. agalactiae* apresentam reconhecimento de antígenos variáveis com anticorpos contra proteínas de membrana de 18 kDa a 80 kDa. Além disso, à medida que a infecção evolui, com 15 dias, há a identificação de anticorpos por outras proteínas acima de 32 kDa e sendo no trigésimo dia o reconhecimento de um maior número de proteínas imunogênicas [39]. Esses resultados possibilitam a compreensão do reconhecimento da MAG_1560 pelo grupo imunizado com o microrganismo inativado ocorrendo a partir de 21 dias de inoculação. No presente estudo, os níveis de anticorpos específicos para proteínas de membrana do micoplasma produzidos pela imunização com proteínas recombinantes e bacterina comparado ao grupo controle, exibiram aumento acima de cinco vezes na produção de anticorpos, enquanto, em outro estudo realizado com ovelhas imunizadas com *M. agalactiae* inativado emulsificado em adjuvante oleoso foi apresentado aumento de três vezes mais na produção. Nesse estudo citado, os animais apresentaram produção de anticorpos durante 5 meses e foi observada imunidade ao desafio com o microrganismo, sendo capaz de prevenir contra sinais clínicos relacionados a doença [40]. O período de persistência de anticorpos apresentado no estudo anterior se assemelha ao período em que houve presença contínua de anticorpos encontrados em maiores níveis em nossa análise, inclusive para a imunização com proteínas recombinantes, apontando assim resultados promissores para um possível desafio com o microrganismo após imunização com proteínas

recombinantes. Além disso, esses dados corroboram com a possibilidade da eficácia de vacinas recombinantes em comparação a vacinas inativadas, uma vez que a imunização com o microrganismo inativado, no estudo anterior, induziu a uma menor produção de anticorpos, em comparação ao nosso estudo, mas ainda assim foi capaz de prevenir sinais clínicos da doença.

É importante considerar que para eficácia de uma resposta imune modulada potente e duradoura de vacinas de subunidade, que são menos reagentes, é necessária a administração conjunta com adjuvantes potentes, considerando que o adjuvante vacinal utilizado está relacionado a aspectos dos anticorpos, como avidéz ou titulação [41,42]. Em um estudo com a proteína recombinante rP42, de choque térmico, os autores observaram que a formulação foi capaz de apresentar desenvolvimento de resposta humoral e celular em suínos quando administrada com adjuvante oleoso. Os autores verificaram a presença de anticorpos específicos para a proteína por mais de 84 dias após a imunização e anticorpos contra o extrato de *Mycoplasma hyopneumoniae* até 63 dias após a imunização [22]. Esse resultado com proteínas recombinantes, corrobora com o nosso estudo sendo identificados anticorpos contra o extrato total de *M. agalactiae* com 42, 128, 168 e 181 dias após a imunização. A produção de anticorpos também foi observada na aplicação de vacinas experimentais recombinantes com adjuvantes oleosos para outras micoplasmoses, como *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* responsáveis pela pleuropneumonia bovina contagiosa, mostrando que a proteção pode ser alcançada com proteínas recombinantes com redução dos sinais clínicos da doença [24]. Estudos com a utilização de proteínas recombinantes como forma de imunização contribuem para reforçar a aplicação desse modelo vacinal. Os dados aqui encontrados quanto a elevada produção de anticorpos proporcionada pela vacina recombinante, encaminha para uma alternativa as vacinas animais atuais existentes para a agalaxia contagiosa, proporcionando desenvolvimento da resposta imune eficaz e segura.

De uma forma geral, neste estudo, entre os grupos avaliados (recombinante e bacterina) foi observado um aumento gradativo na expressão do gene de IL-1B, sendo a expressão máxima observada com 168 dias. Com a ausência de parede celular nos micoplasmas, as proteínas de membrana, em maior abundância as lipoproteínas, desempenham papel importante na imunomodulação do sistema imunológico do hospedeiro [43]. Células mononucleares do sangue periférico quando estimuladas *in vitro* com micoplasma, como *M. bovis*, tendem a apresentar maior expressão de IL-1 β quando comparadas a células não estimuladas [44]. De forma similar, no nosso estudo foi possível observar essa resposta, com aumento da expressão de mRNA de IL-1 β em PBMC's de caprinos após da imunização. Membros da família da

interleucina-1, como IL-1 β , estão intimamente relacionados a resposta imune inata e no processo inflamatório [45]. Por outro lado, foi observado que a citocina IL-1 β pode contribuir na regulação das respostas imunes adaptativas sendo capaz de agir como “citocina de licenciamento” nas funções efetoras de todas as linhagens das células TCD4 de memória [46]. Essas células na reativação pela exposição ao antígeno podem ser protetoras através do aumento de resposta de células B, produzindo citocinas efetoras em grande quantidade no início da resposta ou de forma direta matando células infectadas [47]. Assim, o aumento na expressão de mRNA de IL-1 β de PBMC's em resposta a estimulação das proteínas recombinantes com o passar do tempo pode sugerir a possível atividade da citocina sob essas células de memória. A produção de IL-1 β também pode ser observada a partir da indução por proteínas de membrana associadas aos lipídeos do *Mycoplasma* (LAMPs), derivadas de *M. bovis*, em células embrionárias de pulmão bovino ativando a via NF-KB através da via TLR2 e MyD88 [31]. O mesmo pode ser observado para LAMPs de *M. gallisepticum* em linhagem celular de fibroblasto de embrião de galinha [48]. Células T reguladoras (T(reg)) devem ser superadas por células efetoras para o desenvolvimento de resposta imune apropriada a patógenos, sendo que, as citocinas IL-1 e IL-6, em conjunto, são mediadoras na resistência dessas células. A sinalização de receptores IL-1 via MyD88 são interações importantes para que células Th1 ultrapassem a atividade reguladora das células T(reg) e desenvolvam [49]. Em estudo avaliando a resposta imune humoral e celular de ovelhas imunizadas com vacinas atenuada de *Brucella melitensis*, foi observado resposta de células T(reg) predominante e duradora em PBMC's dos animais, sugerindo importante papel na redução da eficácia protetora da vacina administrada [50]. O aumento da expressão de mRNA de IL-1 β encontrado no presente estudo de animais imunizados em resposta a antígenos de *M. agalactiae* pode estar associada a supressão de células T(reg) contribuindo para o desenvolvimento de células efetoras na resposta imune provocada pela vacina.

A expressão de mRNA de IFN- γ dependente do tempo no grupo recombinante e bacterina em resposta a presença das proteínas recombinantes, na maior parte dos dados, não apresentou diferença na expressão ou produziu níveis mais baixos da citocina em comparação a antes da imunização. Em concordância ao que foi apresentado no nosso estudo, a análise *in vitro* de PBMC's de ovelhas infectadas expostas a *M. agalactiae* permitiu observar também a diminuição da expansão de células positivas para IFN- γ após 60 dias de infecção [51]. A presença de IFN- γ está relacionada a estimulação de macrófagos induzindo a mecanismos antimicrobianos, apresentação antigênica, maturação e diferenciação celular. Citocinas

secretadas por células apresentadoras de antígeno, como IL-12, controlam a produção de IFN- γ que pode ser regulada negativamente pela produção de citocinas como IL-4. [52] Sendo assim, pode ser secretado principalmente por linfócitos ativados, como, por exemplo, células T auxiliares CD4 tipo 1 e inibir a proliferação de células Th2, assim como a produção de IL-4 [53]. Uma vez que essa citocina pode ser regulada negativamente pela presença de IL-4, associada a perfil de células Th2, pode ser indicado aqui, em nosso estudo, a formação no início de um perfil de memória induzido pela resposta humoral nas células do grupo recombinante. Esse perfil de resposta pode ser associado ao encontrado em estudo com camundongos imunizados com *M. agalactiae* inativado emulsionado com FCA que, por sua vez, apresentaram produção de IgG específica ao microrganismo com ativação Th2 e secreção de IL-4 com co-secreção relativamente baixa de citocinas como IFN- γ e IL-12 [29]. É importante considerar que a produção de IFN- γ também pode estar associada ao desenvolvimento de células T auxiliares do tipo 2 a partir da alternância de isótipo de anticorpos [54,55]. Assim, os níveis maiores de mRNA de IFN- γ nos tempos iniciais encontrados no grupo bacterina pode ser relacionado a uma resposta celular inicial, mas também a resposta de perfil Th2. A identificação dos níveis de IFN- γ contribui para compreender o estabelecimento e desenvolvimento de ambos perfis de resposta ao longo do tempo e a sua contribuição para o desenvolvimento de resposta imune protetora.

A citocina IL-12, sendo produto principal de células como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, possui papel central na indução de resposta Th1. Sendo a sua produção fortemente induzida pela presença de produtos microbianos, dentre seus papéis biológicos, a IL-12 está intimamente relacionada a indução da produção de IFN- γ . [56] Essa correlação sinérgica foi observada no grupo recombinante que em 168 dias em comparação ao controle negativo de células não estimuladas, apresentou aumento significativo na expressão de mRNA de IL-12 e IFN- γ . De forma similar, o aumento de ambas citocinas pode ser observado em células mononucleares do baço de camundongos imunizados com vacina de DNA da proteína P48 de *M. agalactiae* [57]. O grupo bacterina em resposta ao estímulo de ambas proteínas, com o passar do tempo apresentou aumento na expressão de mRNA de IL-12. Em resposta a reincidência na exposição das proteínas recombinantes antigênicas em período de 2 horas de cultura, os PBMC's caprinos imunizados, em nosso estudo, aparentemente produziram uma resposta mais rápida com maiores níveis de expressão de IL-12. O desenvolvimento dessa resposta rápida pode estar associado a um perfil de memória proporcionado pela imunização com bacterina impulsionado em resposta as proteínas recombinantes (P40 e MAG_1560) aqui

utilizadas. A resposta de células T de memória, capazes de modular a resposta imunológica de memória, quando expostas ao antígeno, diferindo de células T naïve, possuem a capacidade de produção imediata de citocinas associada a capacidade de recordação rápida para o combate de patógenos [58]. A vacinação em ovinos, independente do modelo de vacinas existentes, contra *M. agalactiae* é capaz de induzir resposta humoral e celular [59].

Iniciando uma resposta imune adaptativa a com especificidade de patógenos, as moléculas de MHC possuem como função central a apresentação de antígenos peptídicos que são processados e apresentados à células T [60]. A classe II de moléculas de MHC desenvolve papel essencial na iniciação de apresentação de antígenos a linfócitos TCD4, estando a sua expressão associada a células apresentadoras de antígenos (APCs), que incluem, macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B [61]. Após a imunização, as células mononucleares dos grupos recombinante e bacterina, com 56 e 168 dias, respectivamente, apresentaram aumento na expressão de mRNA para MHC-II comparado a células sem contato anterior com o antígeno (proteínas recombinantes). Células T de memória por intermédio do reconhecimento de antígeno através de MHC possuem a capacidade de desenvolver uma resposta de recordação potente e aprimorada, sendo isto, um fator crítico para imunidade a longo prazo [62]. Células B também são capazes de expressar em sua superfície moléculas MHC-II, estabelecendo assim contato com células TCD4, através do complexo peptídeo-MHC-II, que contribuem para a sua proliferação e diferenciação [61]. O aumento da expressão da molécula sugere o reconhecimento do sistema imune as proteínas, seja por células T ou B, que é responsável por sequencialmente orquestrar a resposta a ser desenvolvida. Em estudo realizado avaliando a imuno-histoquímica de lesões pulmonares infeccionadas por *M. agalactiae* e *M. bovis* em cabras, foi observado aumento de células mononucleares expressando MHC classe II, sugerindo participação da sinalização da apresentação de antígenos as células por intermédio de resposta celular ou humoral [63]. É importante considerar que as citocinas possuem papel fundamental regulando positivamente MHC de células como macrófagos o que contribuem para o início e desenvolvimento de resposta imune, uma vez que há o reconhecimento através dessas moléculas do antígeno por células T [63,64].

Dessa forma, o presente estudo demonstrou que os grupos imunizados, com proteína recombinante e bacterina, foram capazes de gerar elevada produção de anticorpos durante o período de 6 meses, além de ter apresentado responsividade sorológica de reconhecimento ao extrato total e a porção de proteínas de membrana. Foi possível constatar também responsividade de PBMC's ao longo do tempo ao estímulo gerado pelas proteínas, sendo

possível observar, principalmente o aumento na expressão de mRNA da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Foi apresentada a presença de apresentação antigênica e através das outras citocinas, IFN- γ e IL-12, deduzir sobre a ambiguidade do perfil de resposta presente (celular e humoral). Entretanto, para maior elucidação e complementariedade da resposta formada visa-se necessário a avaliação do papel de outras citocinas e outros mecanismos de resposta estimulados. Os dados aqui apresentados apontam um caminho promissor na formulação de vacina recombinante como alternativa as existentes para agalaxia contagiosa além de contribuir para a compreensão da imunomodulação para obtenção de imunidade proporcionada por proteínas de membrana de *M. agalactiae*.

REFERÊNCIAS

- [1] Bergonier D, Simone F De, Russo P, Solsona M, Lambert M, Poumarat F. Variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett* 1996;143:159–65. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00301-1](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00301-1).
- [2] Gómez-Martín Á, Amores J, Paterna A, De la Fe C. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *Vet J* 2013;198:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.015>.
- [3] Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev Sci Tech* 1997;16:848–73.
- [4] Madanat A, Zendulková D, Pospíšil Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet Brno* 2001;70:403–12. <https://doi.org/10.2754/avb200170040403>.
- [5] Kumar A, Rahal A, Chakraborty S, Verma AK, Dhama K. *Mycoplasma agalactiae*, an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. *Vet Med Int* 2014;2014:1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/286752>.
- [6] Nicholas RAJ, Ayling RD, Loria GR. Ovine mycoplasmal infections. *Small Rumin Res* 2008;76:92–8. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.014>.
- [7] De Azevedo EO, De Alcântara MDB, Do Nascimento ER, Tabosa IM, Barreto ML, De Almeida JF, et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: First report. *Brazilian J Microbiol* 2006;37:576–81. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400033>.
- [8] Campos AC, Teles JAA, Azevedo EO, Nascimento ER, Oliveira MMM, Nascimento SA, et al. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. *Small Rumin Res* 2009;84:70–5. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.06.006>.
- [9] Damasceno EM, Pinheiro RR, Andrioli A, Alves FSF, Lima AMC, Peixoto RM, et al. Seroprevalence and associated risk factors of *Mycoplasma agalactiae* and investigation of coinfection with the caprine lentivirus in Rio Grande do Norte, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2020;52:2111–7. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02234-5>.
- [10] Peixoto RM, Andrioli A, Pinheiro RR, Alves FSF, Santos VWS dos, Sousa MM de, et al. *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina. *Acta Sci Vet* 2018;46:1–7.
- [11] Alcântara MDB, Campos AC, Melo MA, Filho JMP, Nascimento ER, Farias AA, et al. Resposta imunológica em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. *Pesqui Vet Bras*

- 2013;33:561–4. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000500001>.
- [12] Campos AC, Azevedo EO, Alcântara MDB, Silva RBS, Cordeiro AA, Mamede AG, et al. Efficiency of inactive vaccines against contagious agalactia in Brazil. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2013;65:1394–402. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000500018>.
- [13] de la Fe C, Assunção P, Saavedra P, Tola S, Poveda C, Poveda JB. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. *Vaccine* 2007;25:2340–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.050>.
- [14] Chopra-Dewasthaly R, Baumgartner M, Gamper E, Innerebner C, Zimmermann M, Schilcher F, et al. Role of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;66:307–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01010.x>.
- [15] Fleury B, Bergonier D, Berthelot X, Peterhans E, Frey J, Vilei EM. Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infect Immun* 2002;70:5612–21. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5612-5621.2002>.
- [16] Rosati S, Robino P, Fadda M, Pozzi S, Mannelli A, Pittau M. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. *Vet Microbiol* 2000;71:201–10. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00164-9).
- [17] Tola S, Manunta D, Cocco M, Turrini F, Rocchigiani AM, Idini G, et al. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol Lett* 1997;154:355–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00353-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00353-4).
- [18] Tola S, Crobeddu S, Chessa G, Uzzau S, Idini G, Ibba B, et al. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2001;202:45–50. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00234-8).
- [19] Cacciotto C, Addis MF, Pagnozzi D, Coradduzza E, Pittau M, Alberti A. Identification of conserved *Mycoplasma agalactiae* surface antigens by immunoproteomics. *Vet Immunol Immunopathol* 2021;236:110239. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110239>.
- [20] Barbosa MS, Alves RP dos S, Rezende I de S, Pereira SS, Campos GB, Freitas LM, et al. Novel antigenic proteins of *Mycoplasma agalactiae* as potential vaccine and serodiagnostic candidates. *Vet Microbiol* 2020;251:108866. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108866>.
- [21] de Oliveira NR, Jorge S, Gomes CK, Rizzi C, Pacce VD, Collares TF, et al. A novel chimeric protein composed of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens as a vaccine candidate evaluated in mice. *Vet Microbiol* 2017;201:146–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.023>.
- [22] Jorge S, de Oliveira NR, Marchioro SB, Fisch A, Gomes CK, Hartleben CP, et al. The

- Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2014;37:229–36. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.07.001>.
- [23] Marchioro SB, Fisch A, Gomes CK, Jorge S, Galli V, Haesebrouck F, et al. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT_B. *Vet Microbiol* 2014;173:166–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.009>.
- [24] Nkando I, Perez-Casal J, Mwirigi M, Prysliak T, Townsend H, Berberov E, et al. Recombinant *Mycoplasma mycoides* proteins elicit protective immune responses against contagious bovine pleuropneumonia. *Vet Immunol Immunopathol* 2016;171:103–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.010>.
- [25] Perez-Casal J, Prysliak T, Maina T, Wang Y, Townsend H, Berberov E, et al. Analysis of immune responses to recombinant proteins from strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet Immunol Immunopathol* 2015;168:103–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.08.013>.
- [26] Jiang F, He J, Navarro-Alvarez N, Xu J, Li X, Li P, et al. Elongation factor Tu and heat shock protein 70 are membrane-associated proteins from *Mycoplasma ovipneumoniae* capable of inducing strong immune response in mice. *PLoS One* 2016;11:1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161170>.
- [27] Li M, Ma CJ, Liu XM, Zhao D, Xu QC, Wang YJ. Molecular cloning of HSP70 in *Mycoplasma ovipneumoniae* and comparison with that of other mycoplasmas. *Genet Mol Res* 2011;10:834–48. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1193>.
- [28] Messick JB, Santos AP. Identification, bioinformatics analyses, and expression of immunoreactive antigens of *Mycoplasma haemofelis*. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:1275–81. <https://doi.org/10.1128/CVI.05060-11>.
- [29] Avramidis N, Victoratos P, Yiangou M. Adjuvant regulation of cytokine profile and antibody isotype of immune responses to *Mycoplasma agalactiae* in mice 2002;88:325–38.
- [30] Rawadi G, Roman-Roman S. *Mycoplasma* membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1996;64:637–43. <https://doi.org/10.1128/iai.64.2.637-643.1996>.
- [31] Wang Y, Liu S, Li Y, Wang Q, Shao J, Chen Y, et al. *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 β production through the NF- κ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88. *Dev Comp Immunol* 2016;55:111–8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.017>.

- [32] Amills M, Francino O, Sánchez A. Nested PCR allows the characterization of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;48:313–21. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05442-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05442-9).
- [33] Angulo M, Reyes-Becerril M, Cepeda-Palacios R, Tovar-Ramírez D, Esteban MÁ, Angulo C. Probiotic effects of marine *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;103:2339–52. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09621-5>.
- [34] Walia V, Kumar R, Mitra A. Lipopolysaccharide and Concanavalin A Differentially Induce the Expression of Immune Response Genes in Caprine Monocyte Derived Macrophages. *Anim Biotechnol* 2015;26:298–303. <https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1013112>.
- [35] Singh PK, Singh S V., Saxena VK, Singh MK, Singh A V., Sohal JS. Expression Profiles of Different Cytokine Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Goats Infected Experimentally with Native Strain of *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis*. *Anim Biotechnol* 2013;24:187–97. <https://doi.org/10.1080/10495398.2012.762008>.
- [36] Matos L, Muñoz MC, Molina JM, Rodríguez F, Perez D, Lopez A, et al. Protective immune responses during prepatency in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae*. *Vet Parasitol* 2017;242:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.016>.
- [37] Nicholas RAJ. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin Res* 2002;45:145–9. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00095-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00095-0).
- [38] Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, González JM, Ortín A, Fthenakis GC. Vaccination schedules in small ruminant farms. *Vet Microbiol* 2015;181:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.018>.
- [39] Tola S, Manunta D, Cocco M, Turrini F, Rocchigiani AM, Idini G, et al. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol Lett* 1997;154:355–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00353-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00353-4).
- [40] Buonavoglia D, Greco G, Corrente M, Fiorella M, Abramo MD, Latronico F, et al. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. *Res Vet Sci* 2010;88:16–9. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.006>.
- [41] Bobbala S, Hook S. Is There an Optimal Formulation and Delivery Strategy for Subunit Vaccines? *Pharm Res* 2016;33:2078–97. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1979-0>.
- [42] Budroni S, Buricchi F, Cavallone A, Bourguignon P, Caubet M, Dewar V, et al. Antibody avidity, persistence, and response to antigen recall: comparison of vaccine adjuvants. *Npj*

- Vaccines 2021;6. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00337-0>.
- [43] Adamu JY, Wawegama NK, Browning GF, Markham PF. Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis. *Res Vet Sci* 2013;95:321–5. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.016>.
- [44] Nishi K, Gondaira S, Okamoto M, Nebu T, Koiwa M, Ohtsuka H, et al. Effect of *Mycoplasma bovis* on expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases mRNA in bovine synovial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2019;216:109920. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109920>.
- [45] Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- [46] Jain A, Song R, Wakeland EK, Pasare C. T cell-intrinsic IL-1R signaling licenses effector cytokine production by memory CD4 T cells. *Nat Commun* 2018;9:3185. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05489-7>.
- [47] MacLeod MKL, Clambey ET, Kappler JW, Marrack P. CD4 memory T cells: What are they and what can they do? *Semin Immunol* 2009;21:53–61. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.02.006>.
- [48] Yu Y, Chen Y, Wang Y, Li Y, Zhang L, Xin J. TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway regulates IL-1 β production in DF-1 cells exposed to *Mycoplasma gallisepticum* LAMPs. *Microb Pathog* 2018;117:225–31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.037>.
- [49] Campbell DJ. MyD88 and IL-1: Loosening Treg cells' firm grip. *Trends Immunol* 2014;35:95–6. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.02.001>.
- [50] Wang W, Wu J, Qiao J, Weng Y, Zhang H, Liao Q, et al. Evaluation of humoral and cellular immune responses to BP26 and OMP31 epitopes in the attenuated *Brucella melitensis* vaccinated sheep. *Vaccine* 2014;32:825–33. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.028>.
- [51] La Manna MP, Agnone A, Villari S, Puleio R, Vitale M, Nicholas R, et al. Expansion of intracellular IFN- γ positive lymphocytes during *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *Res Vet Sci* 2011;91:e64–7. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.029>.
- [52] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>.
- [53] Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol* 2018;9:1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.

- [54] Reddy NRJ, Borgs P, Wilkie BN. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;74:31–46. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00164-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00164-1).
- [55] Mohr E, Cunningham AF, Toellner K-M, Bobat S, Coughlan RE, Bird RA, et al. IFN- γ produced by CD8 T cells induces T-bet-dependent and -independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:17292–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004879107>.
- [56] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:133–46. <https://doi.org/10.1038/nri1001>.
- [57] Chessa B, Pittau M, Puricelli M, Zobba R, Coradduzza E, Dall’Ara P, et al. Genetic immunization with the immunodominant antigen P48 of *Mycoplasma agalactiae* stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. *Res Vet Sci* 2009;86:414–20. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.09.010>.
- [58] Barski A, Cuddapah S, Kartashov A V., Liu C, Imamichi H, Yang W, et al. Rapid Recall Ability of Memory T cells is Encoded in their Epigenome. *Sci Rep* 2017;7:39785. <https://doi.org/10.1038/srep39785>.
- [59] Kumar A, Rahal A, Chakraborty S, Verma AK, Dhama K. *Mycoplasma agalactiae*, an etiological agent of contagious agalactia in Small ruminants: A review. *Vet Med Int* 2014;2014:7–9. <https://doi.org/10.1155/2014/286752>.
- [60] AMILLS M, RAMIYA V, NORIMINE J, LEWIN HA. The major histocompatibility complex of ruminants. *Rev Sci Tech l’OIE* 1998;17:108–20. <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1092>.
- [61] Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:137–54. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>.
- [62] Saraav I, Wang Q, Brown KM, Sibley LD. Secretory Microneme Proteins Induce T-Cell Recall Responses in Mice Chronically Infected with *Toxoplasma gondii*. *MSphere* 2019;4:1–13. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00711-18>.
- [63] Rodriguez F, Sarradell J, Poveda JB, Ball HJ, Fernández A. Immunohistochemical Characterization of Lung Lesions Induced Experimentally by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in Goats. *J Comp Pathol* 2000;123:285–93. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0418>.
- [64] Nash AD, Barcham GJ, Andrews AE, Brandon MR. Characterisation of ovine alveolar macrophages: regulation of surface antigen expression and cytokine production. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;31:77–94. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90088-8).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A produção de anticorpos dos animais imunizados com proteína recombinante ou bacterina persistiu durante os 181 dias
- A imunização com proteínas recombinantes induziu alta produção de anticorpos específicos para as proteínas recombinantes (P40 e MAG_1560). O soro desses animais imunizados foi capaz de reconhecer o extrato total e proteínas de membrana de *M. agalactiae*.
- As proteínas recombinantes estimulam a expressão gênica da citocina IL1-B com aumento ao longo do tempo em ambos os grupos imunizados.
- Houve redução ou ausência da diferença da expressão de IFN- γ dependente do tempo do grupo recombinante e bacterina estimulado pelas proteínas recombinantes. Foi apresentado níveis maiores, encontrados no grupo bacterina, de mRNA de IFN- γ nos tempos iniciais.
- As proteínas recombinantes são capazes de aumentar expressão de IL-12 em determinados tempos indicando o desenvolvimento de uma resposta celular.
- As proteínas são capazes de estimular a expressão gênica de MHC-II.
- O estudo apresenta duas proteínas recombinantes (P40 e MAG_1560) capazes de estimular o sistema imunológico de caprinos com a produção de anticorpos e estímulo da resposta celular e humoral, para formulação de vacina de subunidade contra agalaxia contagiosa ocasionado por *M. agalactiae*.