

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Construção de vetor oriC de *Mycoplasma hyopneumoniae* – uma ferramenta para estudos genéticos do agente da Pneumonia Enzoótica Suína

Dissertação de Mestrado

Beatriz Machado Terra Lopes

PORTO ALEGRE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Construção de vetor oriC de *Mycoplasma hyopneumoniae* – uma ferramenta para estudos genéticos do agente da Pneumonia Enzoótica Suína

Autora: Beatriz Machado Terra Lopes

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva

PORTO ALEGRE

2007

Beatriz Machado Terra Lopes

CONSTRUÇÃO DE VETOR ORIC DE *Mycoplasma hyopneumoniae* – UMA FERRAMENTA PARA ESTUDOS GENÉTICOS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA

Aprovada em

APROVADO POR:

Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Arnaldo Zaha
Membro da Comissão

Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Júnior
Membro da Comissão

Profª. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a esta Universidade, a sua Faculdade de Veterinária, ao Centro de Biotecnologia e aos seus docentes pela minha formação acadêmica. Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva, à Profa. Dr. Irene Schrank e à Profa. Dr. Marilene Henning Vainstein pelos ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS e ao CNPq por possibilitarem a realização desta dissertação.

Agradeço aos queridos colegas de laboratório Clarissa Magalhães Corrêa, Débora B. Trentini, Fernando Hayashi Sant'Anna, Karyne Maurmann, Luciano Reolon, Maicon Machado, Ricardo Cecagno e Shana de Souto Weber pelo convívio alegre e harmonioso e pela ajuda sempre que necessária. À Shana faço um agradecimento especial pela amizade, acolhimento e carinho desde o primeiro dia em que entrei no laboratório.

Agradeço à Bianca Gervini Bittencourt não somente pelos importantes cultivos de *M. hyopneumoniae*, mas por toda a dedicação, atenção e carinho dispensados para a realização deste trabalho.

Por fim agradeço aqueles que fazem parte da minha família e que são especiais para mim simplesmente por estarem presentes na minha vida.

Este trabalho foi integralmente desenvolvido no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o apoio financeiro do CNPq.

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica, enfermidade distribuída mundialmente em rebanhos suínos nas fases de crescimento e terminação. A pneumonia enzoótica tem sido considerada uma das mais importantes causas de perdas econômicas na suinocultura mundial.

Tendo em vista a disponibilidade dos genomas completos de três linhagens diferentes de *M. pneumoniae*, sendo duas patogênicas (linhagens 7448 e 232) e outra não patogênica (linhagem J) e a ausência de sistemas genéticos adequados para o estudo destes genomas, é necessidade emergente o desenvolvimento de ferramentas genéticas funcionais neste organismo.

Atualmente, cinco espécies de micoplasmas possuem vetores replicativos disponíveis para transformação. No entanto nenhum deles possui a oriC de *M. hyopneumoniae*, e estudos sugerem que estes vetores são espécie-específicos e não seriam replicados em *M. hyopneumoniae*.

Este trabalho teve como objetivos a construção de um vetor replicativo e o desenvolvimento de um sistema para transformação de *M. hyopneumoniae*. Os resultados alcançados constituem uma etapa prévia e imprescindível para o estudo de supostas regiões promotoras nesta espécie.

O plasmídeo replicativo pOSTM construído neste trabalho foi obtido a partir do vetor pUC18, adicionando-se a origem de replicação de *M. hyopneumoniae* e o cassete de expressão do gene de resistência à tetraciclina (*tetM*), controlado pelo promotor do gene da espiralina de *Spiroplasma citri*. A transformação foi realizada através de eletroporação e as células transformantes foram selecionadas pelo fenótipo de resistência à tetraciclina.

Os transformantes resistentes à tetraciclina foram confirmados através da amplificação por PCR de porção do vetor inserido nas células. Tal comprovação permite concluir que o *M. hyopneumoniae* é um organismo susceptível à transformação e que o determinante tetM heterólogo é funcional neste patógeno.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, eletrotransformação, vetor oriC, resistência à tetraciclina.

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of enzootic pneumonia of pigs. The disease has a worldwide distribution in growing and finishing pigs. The enzootic pneumonia has been considered one of the most important causes of economic losses in the worldwide swine breeding.

The now available complete sequences of the genomes of two pathogenic (7448 and 232) and one non-pathogenic strain (J) of *M. hyopneumoniae* and the lack of suitable genetic systems to study these genomes points to the emergent need for the development of functional genetic tools for this organism.

Currently, there are replicating vectors available for five species of mycoplasmas. However none of them possess *oriC* of *M. hyopneumoniae*, and studies suggest that these vectors are species-specific and they would not be functional in *M. hyopneumoniae*.

The aim of the present study was to construct a replicating vector and the development of a system for transformation of *M. hyopneumoniae*. These constitute a previous and essential stage for the study of putative promoter regions in this species.

To construct the replicating plasmid pOSTM the *oriC* of *M. hyopneumoniae* and the expression cassette containing the gene for tetracycline resistance (*tetM*), controlled by spiralin gene promoter of *Spiroplasma citri*, were introduced into the vector pUC18. The transformation was achieved by electroporation and transformants were selected for tetracycline resistance. Tetracycline resistance transformants were confirmed through PCR amplification of portion of the inserted vector. Such evidence allows the conclusion that *M. hyopneumoniae* is amenable to transformation and heterologous *tetM* determinant is functional in this pathogen.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, electroporation, *oriC* vector, tetracycline resistance

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1 Construction and restriction maps of plasmids pOM, pSM, pTM and pOSTM	35
FIGURE 2 Colonies of <i>M. hyopneumoniae</i> strain 7448 transformed with pOSTM and grown in agar Friis medium with tetracycline.....	37
FIGURE 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained using primers SPIR/PstI-UP and SPIR/SalI-DO to detect the presence of pOSMT in the tetracycline-resistant clones of <i>M. hyopneumoniae</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDS	Seqüência codificante - <i>Coding sequence</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio - <i>cetyltrimethylammonium bromide</i>
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HEPES	4-(2-hidroxietil)- 1 -piperazinaetano-ácido sulfônico
IPTG	Isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobase
<i>lacZ'</i>	Fragmento amino-terminal (peptídeo alfa) do gene que codifica a enzima β -galactosidase
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
oriC	Origem de replicação cromossomal
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase - <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCV2	Circovírus suíno tipo 2 -
PE	Pneumonia Enzoótica
PEG	Polietilenoglicol
PIB	Produto interno bruto
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína -
RNA _r	RNA ribossômico
RNA _t	RNA transportador
RNA _t ^{fmet}	N-formil-metionil-tRNA
SDS	Dodecilsulfato de sódio -
SPF	Livre de Patógeno Específico - <i>Specific pathogen free</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa -
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônia
VNTARs	Repetições de aminoácidos em número variável – <i>variable number of aminoacid repeats</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1-	REVISÃO DA LITERATURA	9
1.1 -	A Inserção da Suinocultura na Economia	9
1.2 -	Complexo da Doença Respiratória Suína	10
1.3 -	Pneumonia Enzoótica no Brasil	10
1.4 -	Transmissão da Enfermidade	11
1.5 -	Patogenia da Enfermidade	11
1.6 -	Sinais Clínicos de PE	13
1.7 -	Lesões.....	14
1.8 -	Diagnóstico	14
1.9 -	Coleta de Material	16
1.10 -	Terapia e Profilaxia.....	16
1.11 -	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	17
1.12 -	Fatores de Virulência	19
1.13 -	Transferência Gênica em Micoplasmas	21
1.14 -	Transposons	23
1.15 -	Plasmídios Replicativos	24
1.16 -	Resistência à Tetraciclina.....	26
1.17 -	Sistemas “Reporter”	27
1.18 -	Regiões promotoras.....	27
1.19 -	Objetivos	29
2-	Manuscrito parcial a ser submetido à publicação em revista científica.....	30
2-	DISCUSSÃO GERAL	42
3-	PERSPECTIVAS	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
	APÊNDICE A – Materiais e Métodos	55
	APÊNDICE B – Eletroforese de produtos de PCR.....	61
	APÊNDICE C – Seqüências nucleotídica e de aminoácidos do gene <i>tetM</i>	62

1- REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - A Inserção da Suinocultura na Economia

A sociedade brasileira como um todo tem se beneficiado de várias maneiras do desempenho que o agronegócio vem apresentando desde a década de 1990. Sua produtividade vem crescendo rapidamente e o setor vem gerando substanciais superávits comerciais (BARROS, 2007). Hoje o agronegócio é responsável por 30% dos empregos gerados no Brasil, por 40% das exportações e por um terço do PIB, do qual 30% correspondem ao PIB do agronegócio da pecuária (MAPA, 2007 b; BARROS, 2007).

De 1990 a 2003 a taxa de crescimento da exportação de carne suína no Brasil foi de 27%, participando com 16% da exportação mundial deste produto e sendo o 4º colocado no ranking de países exportadores. O Brasil é o quarto produtor mundial de carnes de suínos e possui o quarto maior rebanho mundial, composto por 38,4 milhões de cabeças, sendo que a Região Sul concentra 70,2 % do abate (FAO, 2007; IBGE, 2007).

Nas projeções até o ano de 2017 a produção mundial de carne suína apresentará crescimento 1,69% ao ano e continuará sendo a carne mais produzida no mundo. No Brasil, esta estimativa é mais animadora, apresentando uma taxa de crescimento de 2,1% ao ano (MAPA, 2007 a).

Em 2015 as exportações de carne suína serão lideradas pelo Brasil, Canadá e União Européia com um volume total de cinco milhões de toneladas. As projeções para o Brasil representam a passagem de exportações de 771 mil toneladas em 2006 para 1,1 milhões em 2015 (MAPA, 2007 a).

Focos de febre aftosa em bovinos nos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, no início de 2006, determinaram a diminuição de 11,1% do valor exportado da carne suína *in natura* em relação ao ano de 2005, devido ao fechamento de mercados importantes e, principalmente, ao embargo não tarifário da Rússia (ABIPECS, 2007). Este fato aponta a importância de investimentos em programas de sanidade animal no Brasil para garantir os grandes mercados compradores e conquistar novos.

Hoje a suinocultura industrial brasileira exhibe indicadores de produtividade que podem ser comparados aos obtidos nos EUA, Canadá, Dinamarca, Alemanha, Holanda

e outros países (ABIPECS, 2005c; ABIPECS, 2005b). O Brasil apresenta o menor custo mundial de produção de suínos (US\$ 0,90/kg carcaça) e uma taxa de 26 terminados/porcas/ano, confirmando a eficiência do nosso setor produtivo (ROPPA, 2007). Com apenas 160 dias de idade, chegam a pesar mais de 110 quilos (ABIPECS, 2005c; ABIPECS, 2005b), sendo o peso médio nacional do suíno abatido em torno de 80 quilos (ABIPECS, 2007).

1.2 - Complexo da Doença Respiratória Suína

Mycoplasma hyopneumoniae participa do grupo de agentes etiológicos do complexo da doença respiratória suína (CDRS) caracterizado por atraso no desenvolvimento, diminuição na conversão alimentar, letargia, anorexia, febre, tosse e dispnéia em animais nas fases de crescimento e terminação (16-22 semanas de idade). A pneumonia apresentada pelos animais com CDRS é causada por uma combinação de agentes bacterianos e virais tais como: PCV2, PRRSV, vírus da influenza suína, *M. hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida* (KIM et al., 2003). Apesar de o PRRSV estar disseminado em rebanhos suínos em todo o mundo, no Brasil o agente ainda não foi identificado e, portanto, não parece ser uma associação importante em rebanhos brasileiros (ZANELLA, 2006). Já o PCV2 pode ser considerado o principal agente desta enfermidade (OPRIESSNIG et al., 2004).

1.3 - Pneumonia Enzoótica no Brasil

O atual sistema de produção de suínos implica na exposição dos animais a diversos agentes estressantes que são determinantes no desenvolvimento de doenças multifatoriais. Entre as doenças respiratórias, de origem multifatorial destacam-se a pneumonia enzoótica (PE) e a rinite atrófica progressiva. Elas são importantes devido a sua freqüência e por que provocam prejuízos econômicos consideráveis tanto aos produtores como à indústria. O termo enzoótica evidencia tratar-se de uma doença de rebanho não de uma doença que atinge animais individualmente (SOBESTIANSKY et

al., 2001 a). A alta prevalência da PE implica em importantes perdas econômicas na indústria da suinocultura em todo o mundo (SCHMIDT et al., 2004).

Utilizando como parâmetro a prevalência de leitões infectados no desmame para calcular a gravidade da PE, o cenário de média infecção (5-20% leitões infectados) seria o mais comum, atualmente, nos sistemas de dois sítios ou múltiplos sítios encontrados no Brasil. Este resultado está associado à alta reposição de leitões negativos, o que leva à diminuição da imunidade do plantel. Ocorre difusão precoce do agente e colonização de leitões ainda na fase de lactação. A difusão média do agente no ambiente associada à segregação por idade em dois ou mais sítios, tem como o resultado o aparecimento dos sintomas nas fases intermediárias e finais da terminação (BARCELLOS, 2006).

A PE apresenta alta morbidade e baixa mortalidade e as perdas econômicas são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e infecções secundárias (SOBESTIANSKY et al., 1999). Sobestiansky et al. (2001 b), em um estudo envolvendo 3788 suínos de granjas da região sul do país estimaram perdas de 2,52 kg/suíno abatido devido a lesões pneumônicas desde o nascimento até o abate.

1.4 - Transmissão da Enfermidade

A principal forma de transmissão da infecção pelo *M. hyopneumoniae* é o contato direto com as secreções respiratórias de animais infectados, por contato com aerossóis induzidos pela tosse ou, menos frequentemente, por fômites (BARCELLOS, 2006). A transmissão por contato direto ocorre rapidamente, sendo o agente detectado no sétimo dia após o desafio (MAROIS et al., 2007).

A fonte de infecção de *M. hyopneumoniae* para o suíno jovem são as matrizes ou os animais em crescimento ou terminação (SOBESTIANSKY et al., 2001 a).

1.5 - Patogenia da Enfermidade

Um dos primeiros passos da patogênese da infecção por *M. hyopneumoniae* é a aderência do agente ao trato respiratório, afetando as células epiteliais e o sistema de defesa mucociliar das vias aéreas (ZIELINSKI & ROSS, 1992; CHOI et al., 2006). No estudo de MEYNS et al. (2006) foi observada a presença por imunofluorescência (IF)

de *M. hyopneumoniae* no epitélio de brônquios e bronquíolos de suínos inoculados tanto com isolados de alta virulência quanto de baixa, indicando que ambos aderem às células do trato respiratório.

A multiplicação de *M. hyopneumoniae* em pulmões de suínos resulta em pneumonia caracterizada por infiltrado celular de macrófagos, neutrófilos e linfócitos (MEYNS et al., 2006). Tem sido proposto que os macrófagos alveolares participam do início da resposta inflamatória logo após a infecção e rapidamente expressam IL-1 e TNF- α . Estas citocinas são fatores ativadores de linfócitos T, sendo TNF- α também responsável pela mobilização de neutrófilos (CHOI et al., 2006).

Citocinas inflamatórias tais como IL-1, TNF- α e IL-6 são importantes mediadores tanto da defesa pulmonar quanto da inflamação. Um dos principais efeitos comum aos micoplasmas é a habilidade de induzir a liberação de citocinas. Estudos prévios revelaram que citocinas inflamatórias estão presentes em excesso no líquido broncoalveolar de suínos infectados com *M. hyopneumoniae* (CHOI et al., 2006). CHOI et al.(2006) demonstraram a expressão de IL-1, TNF- α e IL-6 uma semana após a infecção, antes do aparecimento de mudanças patológicas e durante a doença, sugerindo que estas citocinas são importantes na acumulação de células inflamatórias

Micoplasmas possuem fatores mitogênicos para linfócitos, os quais seriam responsáveis pela hiperplasia linfóide peribronquiolar característica desta doença. Os micoplasmas são considerados super-antígenos capazes de estimular excessivo número de células T pela exposição de vários epitopos simultaneamente (RIBEIRO et al., 2004). Uma depleção no número de linfócitos T diminui a extensão das lesões pneumônicas. Além disso, uma superprodução de IL-1 e TNF- α dentro dos pulmões pode exacerbar o efeito do *M. hyopneumoniae* e causar um dano ao tecido mediado pelo hospedeiro. Assim, a patogênese da pneumonia micoplásmica é dependente não somente do dano causado ao cílio diretamente pelo organismo, mas também é dependente do efeito do sistema imune do hospedeiro sobre as células (CHOI et al., 2006).

Atraso no desenvolvimento pode ser devido à indução de altas concentrações de TNF- α , o qual é conhecido por causar caquexia ou síndrome de definhamento (CHOI et al., 2006).

O agente escapa das defesas naturais do hospedeiro fixando-se firmemente à sua mucosa respiratória, podendo sua localização no lúmen explicar a dificuldade de eliminação do agente pelos mecanismos de defesa do hospedeiro e tratamento

antimicrobiano (SOBESTIANSKY et al., 2001 a). Além disso, o micoplasma tem a habilidade de mimetizar várias superfícies antigênicas e utilizar-se dessa variação para evadir-se do sistema imune (RIBEIRO et al., 2004). Ele pode reconfigurar os antígenos nas suas superfícies celulares, ligar-se inespecificamente à porção Fc de anticorpos e também secretar protease de IgA (SOBESTIANSKY et al., 2001 a).

Mycoplasma hyopneumoniae foi re-isolado a partir do fígado e baço de suínos experimentalmente infectados e de suínos infectados por contato (MAROIS et al., 2007). Disseminação de *M. hyopneumoniae* para órgãos internos pode acontecer pela via linfática ou via sanguínea. No entanto, a disseminação do agente em órgãos internos parece ser transitória e provavelmente não participa do desenvolvimento da PE (MAROIS et al., 2007).

1.6 - Sinais Clínicos de PE

O principal sinal clínico da infecção por *M. hyopneumoniae* é a tosse seca, não produtiva e crônica que persiste por poucas semanas e até por meses (ROSS, 1999). A forma clínica da doença é mais comum nos animais em fase de crescimento e terminação, mas em rebanhos sem imunidade a doença pode afetar leitões já a partir de duas semanas de idade, bem como animais em reprodução (SOBESTIANSKY et al., 2001 a). Animais com infecção secundária podem apresentar anorexia, dispnéia, tosse, hipertermia e prostração. A maioria dos animais com PE não parecem doentes. Podem apresentar atraso no desenvolvimento, embora o apetite se mantenha normal (ROSS, 1999).

Além das condições de manejo e instalações, o resultado clínico da infecção por *M. hyopneumoniae* pode depender da virulência da linhagem, visto que já foi mostrada diferença de virulência em isolados de campo (MEYNS et al., 2006).

A manifestação clínica pode passar despercebida quando ocorre a infecção só por *M. hyopneumoniae* e na ausência de fatores de risco (SOBESTIANSKY et al., 2001 a)

1.7 - Lesões

Lesões macroscópicas de pulmão de suínos com PE consistem em áreas de consolidação do parênquima pulmonar com coloração púrpura a cinza. As lesões são localizadas nos lobos apicais, cardíacos, intermediário e região ântero-ventral dos diafragmáticos (SOBESTIANSKY et al., 1999), devido a fatores aerodinâmicos e gravitacionais que produzem uma maior carga de infecção nos lobos craniais (ANDRADA et al., 2003a). Os linfonodos mediastínicos e bronquiais apresentam aumento de tamanho (ROSS, 1999).

Lesões histopatológicas na fase aguda da doença são caracterizadas pela perda dos cílios do trato respiratório, descamação das células ciliadas e acumulação de neutrófilos e macrófagos nas vias aéreas. No parênquima pulmonar observa-se broncopneumoniae catarral, com edema alveolar e acúmulo de neutrófilos e macrófagos. A partir do 15º ao 20º dia de infecção observa-se acúmulo de células mononucleares engrossando os septos inter-alveolares e caracterizando a broncopneumonia como intersticial. Observa-se hiperplasia perivascular e peribronquial do BALT (Tecido Linfóide associado aos Brônquios). No estágio crônico, há hiperplasia linfóide ou espessamento do septo interalveolar (CHOI et al., 2006; ANDRADA et al., 2003a).

1.8 - Diagnóstico

Apesar de a cultura ser considerada o teste padrão ouro para diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, o isolamento do organismo a partir de suínos naturalmente ou experimentalmente infectados é limitado principalmente pelo fato de que este micoplasma é extremamente fastidioso, freqüentemente exigindo 4 a 8 semanas para multiplicação detectável (ROSS, 1999; MAROIS et al., 2007; THACKER, 2004). Devido à sua multiplicação lenta em cultura, a contaminação por *M. hyorhinitis*, *M. flocculare* ou outras bactérias, freqüentemente presentes no trato respiratório de suínos, pode inibir a multiplicação de *M. hyopneumoniae* (THACKER, 2004). *Mycoplasma flocculare*, microorganismo não patogênico presente no pulmão de suínos, possui morfologia, multiplicação e características antigênicas semelhantes ao

M. hyopneumoniae (ROSS, 1999; MAROIS et al., 2007). A utilização de antibióticos e outros quimioterápicos na alimentação dos animais pode mascarar e comprometer os resultados do isolamento microbiológico (RIBEIRO et al., 2004). Dessa forma, o fracasso do isolamento do organismo em condições a campo não deve ser utilizado para refutar a presença de *M. hyopneumoniae* dentro do rebanho (THACKER, 2004).

O diagnóstico rápido de PE é possível através do teste PCR. A amplificação dos genes p36 e p46, encontrados somente em *M. hyopneumoniae*, e também seqüências internas destes genes elimina os riscos de obter amplificação de falsos positivos devido à reação cruzada com outro micoplasma ou outras espécies de bactérias (MATTSSON et al., 1995; CARON et al., 2000).

De Castro et al. (2006) desenvolveram teste de PCR para identificação de linhagem de *M. hyopneumoniae* baseado em VNTARs, o qual é útil para diagnóstico de PE, tipificação de linhagens e discriminação das linhagens vacinais daqueles isolados de campo em animais vacinados para PE.

A técnica de PCR para a detecção de *M. hyopneumoniae* é uma ferramenta para a identificação de animais portadores sadios e para a prevenção da disseminação da doença (CARON et al., 2000).

As técnicas de anticorpo fluorescente (FA) e imunoistoquímica (IHC) são utilizadas para identificação de *M. hyopneumoniae* em tecidos. RIBEIRO et al. (2004) demonstraram que a técnica de imunoistoquímica com anticorpo policlonal possui alta sensibilidade (95%) e moderada especificidade (77,5%) podendo ser recomendada como ferramenta auxiliar, rápida e de baixo custo para diagnóstico de PE em laboratórios de rotina em histopatologia. A hibridização *in situ* em tecido fixado é utilizado menos freqüentemente (THACKER, 2004).

Os métodos para diagnóstico sorológico de PE incluem hemaglutinação indireta (HI), fixação do complemento (FC) e ELISA (ROSS, 1999).

A baixa sensibilidade dos testes de ELISA para *M. hyopneumoniae* pode ser atribuída ao fato que o organismo coloniza as vias aéreas resultando em interação mínima com o sistema imune sistêmico e resultados sorológicos variáveis. A variação antigênica das proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* resulta em resposta imune por anticorpos variável que é um desafio para a utilização deste teste. Uma alta porcentagem de resultados falso-negativos deve ser considerada quando os resultados forem interpretados (THACKER, 2004).

Reações cruzadas com *M. flocculare* e *M. hyorhinis* reduzem a especificidade dos testes sorológicos (BAUMEISTER et al, 1998). O teste ELISA tipo duplo-sanduíche utilizando anticorpos monoclonais contra o antígeno p46 do *M. hyopneumoniae* e a proteína recombinante p46 é específico para *M. hyopneumoniae* e pode ser utilizado para determinar o perfil sorológico do rebanho e assim indicar o início da doença ou o melhor momento para realizar a vacinação contra PE (OKADA, 2005).

A presença do organismo sozinho nem sempre é correlacionado com doença ou pneumonia. No entanto, se o *M. hyopneumoniae* estiver presente e o rebanho exibir doença respiratória clínica, pode-se supor que o organismo está contribuindo para a patologia de maneira primária ou secundária (THACKER, 2004).

Devido às características singulares dessa enfermidade, o diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela conjunção dos sinais clínicos e dos aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões. Todavia, esse procedimento possui uma parcela de subjetividade e imprecisão, sendo necessários exames complementares para a confirmação do diagnóstico (RIBEIRO et al., 2004).

1.9 - Coleta de Material

Suabes da traquéia e lavado traqueobronquiolar são os locais ideais para coletar amostras em comparação aos suabes nasal e tonsilar (MAROIS et al., 2007) e até mesmo em relação ao tecido pulmonar (KURTH et al., 2002). Suabe traqueal é a amostra mais eficiente para detectar *M. hyopneumoniae* em suínos vivos porque é 4,5 vezes mais sensível em comparação ao suabe nasal. No entanto, é difícil de realizar em suínos adultos em condições de campo, enquanto o suabe nasal é realizado frequentemente nas granjas (MAROIS et al., 2007).

1.10 - Terapia e Profilaxia

Embora vacinas que reduzem as conseqüências da infecção estejam disponíveis, medicação com antimicrobianos na comida ou na água de beber ainda é uma prática comum (VICCA et al., 2004). Os antibióticos mais eficazes e utilizados para controle da PE são: tetraciclina, tiamulina, tilosina, espiramicina, valnemulina, lincomicina e as

novas quinolonas enrofloxacina, danofloxacina e norfloxacina (ANDRADA et al., 2003 b).

As únicas vacinas contra PE disponíveis comercialmente são as bacterinas. Estas são incapazes de prevenir a colonização do trato respiratório do suíno pelo *M. hyopneumoniae* e sua produção é cara (YOUNG et al., 2000; FAGAN et al., 2001). Novas vacinas contra esta doença vêm sendo desenvolvidas, destacando-se aquelas que estimulam a produção de IgA na mucosa respiratória suína (CONCEIÇÃO & DELLAGOSTIN, 2006).

Fagan et al. (1997, 2001) mostraram que a imunização oral com *Salmonella typhimurium* atenuada (aroA) expressando o antígeno recombinante NrdF (ribonucleotide reductase R2 subunit - subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase) induziu secreção de IgA em pulmões de camundongos, e ainda resultou em um maior ganho de peso diário e redução das lesões pulmonares em suínos.

Uma vacina intranasal atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* expressando a porção amino-terminal da adesina P97 (YS-19) demonstrou reduzir a severidade das lesões pulmonares causadas pela infecção por *M. hyopneumoniae*. Nenhuma resposta imune humoral ou celular foi observada nos animais imunizados e o mecanismo que determina a proteção é desconhecido. Anticorpos específicos contra a proteína P97 não foram detectados, o que sugere que estes não desempenham função protetora contra a infecção por *M. hyopneumoniae* (SHIMOJI et al, 2003).

1.11 - *Mycoplasma hyopneumoniae*

Micoplasmas são microrganismos da classe *Mollicutes* e da ordem *Mycoplasmatales* (QUINN, 2005; WALKER, 2003). Em 1898, Edmond Nocard e Emilie Roux identificaram o primeiro micoplasma, o agente da pleuropneumonia contagiosa bovina, que, mais tarde, recebeu o nome *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (BOVÉ, 1999). Em 1950, o termo microrganismos semelhantes aos da pleuropneumonia (PPLO) foi substituído pelo nome *Mycoplasma*, do grego *mykes* (fungo) e *plasma* (moldável) (BOVÉ, 1999).

Mare & Switzer (1965) e Goodwin et al. (1965) foram os primeiros a relatar o isolamento de micoplasma a partir de pulmões com pneumonia e a reprodução experimental da doença (apud ROSS, 1999).

A multiplicação de *M. hyopneumoniae* é mais lenta quando comparada com outras espécies de micoplasmas de suínos. O organismo se multiplica em meio sólido somente na presença de 5-10% de CO₂ (FRIIS, 1974). *Mycoplasma hyopneumoniae* pode se multiplicar em ovos embrionados de galinha sem efeito patogênico visível e em cultivos celulares apresentando pequeno efeito citopatogênico (FRIIS, 1974).

Friis (1974) desenvolveu um meio especial para isolamento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*. Este meio possui como indicador de pH o vermelho fenol. A multiplicação microbiana é visível quando ocorre a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, indicando a oxidação da glicose pelo *M. hyopneumoniae* e produção de ácido.

Devido ao fato de não sintetizarem peptidoglicano ou seus precursores, não possuem parede celular rígida, mas uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. Sua flexibilidade permite-lhes passar através de membranas filtrantes com poros do tamanho de 0,22 a 0,45 µm e apresentar diversas formas (QUINN, 2005; WALKER, 2003).

Os micoplasmas são bastante pleomórficos em função da ausência de parede celular. A célula pode ser esférica, em forma de pêra, em forma de espiral ou filamentosa. O diâmetro da forma esférica varia de 0,3 a 0,8 µm. Os micoplasmas multiplicam-se lentamente em meio de cultivo após incubação de 3 a 20 dias, a uma temperatura ótima de 37 °C, pH em torno de 7,5, atmosfera de 5 a 10% CO₂ e leve agitação (WALKER, 2003).

As colônias tornam-se visíveis após 2 a 3 dias de incubação, porém o mais comum é observá-las após 10 dias, quando estão com aproximadamente 0,25 a 1 mm de diâmetro (ROSS, 1999). As colônias possuem aparência granular com elevações refrativas no ágar (FRIIS, 1974). São recomendadas as colorações Giemsa, Castañeda, Dienes e novo azul de metileno (WALKER, 2003).

Os mollicutes no teste de Gram não são corados, no entanto, baseado na análise da seqüência do RNAr 5S, são filogeneticamente relacionados às eubactérias gram-positivas. De fato, esta classe de organismos evoluiu a partir da classe Clostridia,

através de um processo de evolução reductiva (TRACHTENBERG, 1998; QUINN, 2005).

Similar às mitocôndrias as espécies de *Mycoplasma* utilizam o códon UGA para codificar triptofano (KANNAN & BASEMAN, 2000).

Em geral, os genes de micoplasma que possuem um ou mais códons UGA não serão expressos em sistemas de expressão que utilizam o código genético universal, devido à terminação prematura. Uma exceção é a rara leitura do códon UGA como códon de terminação em *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Embora UGA também funcione como códon de terminação em *Bacillus subtilis*, a presença de RNAt que lê códon de terminação UGA como triptofano determina alta eficiência de leitura nesta bactéria gram-positiva (KANNAN & BASEMAN, 2000).

Além do código genético, existem outros dois fatores que dificultam a análise molecular de *M. hyopneumoniae*. O primeiro é a falta de sistemas genéticos eficazes que permitam a geração de *M. hyopneumoniae* mutantes específicos. Um segundo é também a falta de sistemas repórter que possam ser utilizados para estudo da atividade de promotores e seus mutantes *in vivo* (HALBEDEL & SÜLKE, 2006).

Micoplasmas são diferenciados fenotipicamente de outras bactérias pelo seu diminuto tamanho e ausência de parede celular. Taxonomicamente, a ausência de parede celular é utilizada para separar os micoplasmas de outras bactérias na classe *Mollicutes* (RAZIN et al., 1998).

1.12 - Fatores de Virulência

O seqüenciamento do genoma das três linhagens de *M. hyopneumoniae* (232, 7448 e J) não só permite rápida identificação de proteínas, como também permite a comparação de proteínas identificadas nas três linhagens, se presentes. Embora variação gênica entre os genomas de isolados já foi observada, até hoje, nenhum marcador genético associado com virulência foi identificado (MEYNS et al., 2006).

Os fatores de virulência em *M. hyopneumoniae* ainda não foram claramente estabelecidos, exceto a proteína P97, adesina de cílios. O gene da adesina contém seis genes parálogos no genoma, mas apenas a interação com a proteína P97 permite que o *M. hyopneumoniae* se fixe aos cílios do epitélio respiratório. Um segundo gene (p102)

do operon p97-p102, também contém seis genes parálogos, mas sua função é desconhecida (MINION et al., 2004). Nas três cepas comparadas por Vasconcelos et al. (2005) a CDS p97 está ligada à CDS p102 constituindo três operons.

A análise de domínios no genoma de *M. hyopneumoniae* cepa 232 identificou 53 ORFs com sítios de ligação para lipoproteínas, representando 8,5% da capacidade codificante do genoma (MINION et al., 2004).

Três lipoproteínas com massa molecular de 44, 50 e 65 kDa foram identificadas na linhagem J de *M. hyopneumoniae*, sendo a p65 utilizada para diagnóstico sorológico de infecção por *M. hyopneumoniae* (SCHMIDT et al., 2004). A p65 é um membro da família de enzimas lipolíticas que possuem a porção amino-terminal conservada Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL) e apresenta-se como principal antígeno de superfície imunodominante de *M. hyopneumoniae* (SCHMIDT et al., 2004).

Quatro adesinas conhecidas (P97, P146, P76 e P216) apresentam VNTARs em diferentes linhagens aumentando a complexidade do processo de adesão. Estas VNTARs são estáveis *in vitro* e o número de repetições é cepa-específico (DE CASTRO et al., 2006).

Embora desprovidos de parede celular micoplasmas são capazes de resistir à lise total, característica que em *Mycoplasma pulmonis* é dependente do número de repetições em *tandem* em diferentes antígenos de superfície (SIMMONS et al., 2004). Em *M. hyopneumoniae*, a variabilidade antigênica gerada pelas VNTARs pode ter importante função no mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro (DE CASTRO et al., 2006).

A molécula P97 não é uma lipoproteína e ela contém um domínio transmembrana na porção amino-terminal (DJORDJEVIC et al., 2004).

CDSs p97 de *M. hyopneumoniae* cepa 7448, 232 e J codificam proteínas com 10, 15 e 9 repetições R1 em tandem respectivamente. O domínio de ligação da P97 está dentro da região R1 e os aminoácidos que estão à montante nesta região não são necessários para a adesão ao cílio. São necessárias no mínimo oito repetições da região R1 para o sítio ser funcional e ocorrer a adesão aos cílios (MINION et al., 2000). Todas as linhagens possuem mais que o número mínimo de repetições, dado que leva a acreditar que outro fator de adesão deve ser responsável pelas diferentes propriedades de adesão das três linhagens (VASCONCELOS et al., 2005).

Djordjevic et al. (2004) estudaram o processo proteolítico da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* e constataram que esta molécula é hidrolisada em múltiplos sítios,

gerando uma família de peptídios que permanecem em associação com a célula ou com proteínas da matriz extracelular. A hidrólise no aminoácido 195 ocorre imediatamente após a tradução e, provavelmente, conjuntamente com a translocação, gerando P94, P22 e outros fragmentos da hidrólise.

De acordo com Vasconcelos et al (2005) diferenças entre adesinas e outros fatores de virulência em *M. hyopneumoniae* linhagens 7448, 232 e J incluem variações no número repetições de aminoácidos entre proteínas ortólogas. Estas inserções/deleções resultam de variações no número de repetições em *tandem* de nucleotídeos dentro das regiões codificantes, o que é indicativo do mecanismo molecular envolvido na geração de variantes antigênicos funcionais ou não. Esta variabilidade antigênica em proteínas de superfície é provavelmente a chave determinante das diferentes propriedades patogênicas de cada cepa de *M. hyopneumoniae*.

A identificação e caracterização de proteínas imunogênicas espécie-específicas de *M. hyopneumoniae* é um importante passo para a elucidação dos mecanismos de patogenicidade e também para o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico e componentes vacinais (MEENS et al., 2006).

No estudo de Meens et al. (2006) foi demonstrada a propriedade antigênica de duas lipoproteínas hipotéticas expressas como proteínas de fusão recombinantes, Mhp378 e Mhp651. Nas análises de *Western blot* e ELISA ambas as proteínas foram reconhecidas pelos soros de suínos naturalmente infectados e de suínos hiperimunizados. A Mhp378 parece ser altamente específica de *M. hyopneumoniae* enquanto a Mhp651 mostrou uma pequena reatividade cruzada com *M. flocculare*.

1.13 - Transferência Gênica em Micoplasmas

A ausência de parede celular em mollicutes seria uma característica que facilitaria a introdução de DNA exógeno dentro das células. No entanto, a eficiência de transferência gênica pelos mecanismos de conjugação natural e transformação é muito baixa, sendo necessárias microgramas de DNA para obtenção de células transformantes. Protocolos de transformação e transfecção utilizando PEG ou descarga elétrica têm sido

utilizados com certo sucesso para melhorar a eficiência de transformação (RAZIN et al., 1996; MINION & KAPKE, 1998).

Conjugação entre micoplasmas já foi relatada. No entanto, o mecanismo de transferência genética ainda não é compreendido e os gêneros capazes de conjugação são limitados. Muitos micoplasmas podem adquirir o transposon conjugativo Tn916 através do cruzamento com enterococos doador, mas nenhuma transferência por conjugação de qualquer elemento genético, inclusive Tn916, a partir de um micoplasma doador foi descrita. Todavia, evidências sugerem que a transferência horizontal de genes já ocorreu entre espécies de *Mycoplasma*. O elemento integrativo IS1221 é encontrado em *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Estas três espécies são parasitas de suínos e IS1221 pode ter se disseminado por transferência gênica horizontal no hospedeiro (TEACHMAN et al., 2002; MAHAIRAS et al., 1990).

Embora se tenha conhecimento da existência de fagos em micoplasmas, transdução ainda não foi descrita (TEACHMAN et al., 2002).

Assim, transformação é o único mecanismo seguro para manipulação gênica em micoplasmas (MINION & KAPKE, 1998).

Dois plasmídios foram isolados em diferentes linhagens de *Mycoplasmas mycoides* subespécie *mycoides* abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de sistemas para estudos de genes em micoplasmas (KING & DYBVIG, 1992). Bergmann et al (1989) descreveram o primeiro destes plasmídeos, pADB201. O segundo plasmídio isolado da cepa GM12 de *Mycoplasmas mycoides* subespécie *mycoides* foi denominado pKMK1 (KING & DYBVIG, 1992). Ambos pertencem à família de plasmídios de bactérias gram-positivas que replicam a partir de um DNA intermediário de fita simples (KING & DYBVIG, 1994).

Do gênero *Spiroplasma* também foram isolados plasmídios naturais e vetores de clonagem foram construídos a partir de um destes plasmídios (pMH1), entretanto eles se mostraram instáveis (Simoneau & Labarere, 1990 apud KING & DYBVIG, 1994).

Naturalmente estes plasmídios foram considerados como candidatos para construção de vetores de clonagem e vetor *shuttle* em espécies de *Mycoplasma* (RAZIN et al., 1998).

King & Dybvig (1992) desenvolveram os primeiros vetores de clonagem replicativos em micoplasmas. Plasmídios p2D4 e pIK Δ derivados do pKMK1 de *M. mycoides* foram utilizados para introduzir o gene de resistência à eritromicina de bactéria gram-positiva em *M. mycoides*. A resistência se manteve estável, mesmo na

ausência de eritromicina, indicando que estes plasmídios têm potencial para serem vetores de clonagem para micoplasmas. Podem ser veículos para inserção de genes exógenos em micoplasmas ou para geração de mutações em genes endógenos via recombinação com os fragmentos clonados (KING & DYBVIG, 1994). A deficiência destes vetores é que eles são vetores de baixo número de cópias e replicam apenas em *M. mycoides* e *M. capricolum* (RAZIN et al., 1998).

1.14 - Transposons

Transposons têm se mostrado como ferramentas eficientes de mutagênese em genomas de mollicutes. O estudo de mutantes possibilita a relação entre fenótipo e seu genótipo correspondente, visto que mutantes com fenótipo diferente do tipo selvagem permitem o isolamento do gene (LARTIGUE et al., 2002).

Os primeiros relatos de transposição em mollicutes foram de experimentos com *M. pulmonis* e *Acholeplasma laidlawii*. Estes foram transformados com sucesso pelo plasmídio pAM120, contendo o transposon de *Enterococcus faecalis* Tn916 que integra-se em sítios aleatórios do genoma destes organismos (HALBEDEL & STÜLKE, 2006). Desde então uma variedade de espécies de mollicutes têm sido transformadas para resistência à tetraciclina com Tn916 e Tn1545 ou para resistência à gentamicina com o transposon conjugativo de estafilococos Tn4001 (RAZIN et al., 1998).

Tn916 é um transposon conjugativo composto de genes *xis-Tn/int-Tn* de excisão e integração, gene *tetM* e grupo de genes *tra* necessários para a transferência entre células. Por ser um transposon conjugativo pode ser introduzido em diferentes espécies de micoplasmas por conjugação com *Enterococcus faecalis* (HALBEDEL & STÜLKE, 2006).

Tn4001 é um transposon classe I, composto de 4,7 kb e originalmente isolado de *Staphylococcus aureus*. Ele tem sido utilizado para transformação de diversas espécies de micoplasmas e confere resistência aos antibióticos gentamicina, canamicina e tobramicina (HALBEDEL & STÜLKE, 2006). *Mycoplasma pulmonis*, *M. pneumoniae* e *M. gallisepticum* foram eficientemente transformados com o plasmídio pISM1001 que contém Tn4001, sendo utilizado no primeiro o protocolo com PEG e nos outros dois eletroporação. A resistência à gentamicina foi conferida aos transformantes das três

espécies citadas através da inserção de Tn4001 em sítios aleatórios no DNA cromossomal (HEDREYDA et al., 1993; CAO et al., 1994). Da mesma forma, o primeiro relato de transformação de duas espécies de micoplasmas patogênicas para ruminantes utilizou plasmídeo contendo Tn4001 e ocorreu a integração deste em vários sítios do genoma de *M. bovis* e *M. agalactiae* (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005b).

Uma desvantagem da utilização do Tn4001 em micoplasmas é a ocorrência de múltiplos sítios de inserção no genoma, fato que dificulta a análise de mutantes. Um mini transposon Tn 4001- tetM foi construído com o gene que codifica a transposase fora do Tn 4001 para prevenir a excisão do transposon após o primeiro evento de transposição. Este sistema foi eficiente para transformação em *M. gallisepticum*, porém foram encontradas inserções do transposon em múltiplos sítios (POUR-EL et al. 2002).

Esta técnica de mutagênese com transposons tem sido eficaz para gerar mutantes de *M. pneumoniae*, *M. genitalium* e *M. gallisepticum* deficientes em citoaderência (REDDY et al., 1996; MUDAHI-ORESTEIN et al., 2003; DHANDAYUTHAPANI et al., 1999), mutantes de *S. citri* deficientes em motilidade e patogenicidade (FOISSAC et al., 1997). A caracterização destes mutantes contribuiu significativamente para a identificação de genes e seus produtos (RAZIN et al., 1998).

Um recente sistema para estudar atividade de regiões promotoras de *M. pneumoniae* foi proposto por Halbedel & Stülke (2006). O plasmídeo pGP353 é derivado de um mini Tn4001, possui origem de replicação de *E. coli*, genes de resistência à canamicina e gentamicina e como sistema repórter gene *lacZ*.

1.15 - Plasmídios Replicativos

Plasmídios construídos com a origem de replicação cromossomal do seu hospedeiro estão sendo utilizados para expressão de genes clonados e inativação específica de genes do tipo selvagem através de recombinação homóloga e subsequente investigação do fenótipo do mutante (LARTIGUE et al., 2002).

Atualmente, o uso de plasmídios replicativos em micoplasmas é restrito a cinco espécies *Spiroplasma citri* (YE et al., 1994), *M. pulmonis* (CORDOVA et al., 2002), *M. agalactiae* (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005a), *M. capricolum* subsp.

capricolum (Janis et al., 2005; LARTIGUE et al., 2003), *M. mycoides* subsp. *mycoides* large colony - MmmLC and *M. mycoides* subsp. *mycoides* small colony - MmmSC (LARTIGUE et al., 2003).

Lartigue et al (2003) estudaram a especificidade de plasmídios oriC em mollicutes (MmmLC, MmmSC e *Mycoplasma capricolum* subsp *capricolum*, *Spiroplasma citri* e *Mycoplasma pulmonis*) através de experimentos de transformação com plasmídios oriC homólogos e heterólogos. Todas as espécies de micoplasma e espiroplasma estudadas apresentaram colônias resistentes à tetraciclina quando transformadas com plasmídio oriC homólogo. Não foi observada compatibilidade de plasmídios oriC entre *M. pulmonis* e *S. citri*. Transformantes de *S. citri* foram obtidos exclusivamente com plasmídios homólogos. MmmLC e MmmSC que são altamente relacionados foram transformados com plasmídios recíprocos. *M. capricolum* subsp *capricolum* foram transformados tanto com plasmídios oriC do grupo micoides como de *S. citri*. Desta forma, vetores oriC de mollicutes parecem ser espécie-específicos.

Plasmídios oriC são eficientemente replicados em seus hospedeiros quando possuem o gene *dnaA* flanqueado pelas seqüências DnaA-box (Janis et al., 2005).

Vetores oriC de bactérias gram-positivas têm tendência a integrar-se através de recombinação homóloga envolvendo um evento de *crossing over* na região oriC. Uma vez integradas ao cromossomo as seqüências permanecem estáveis na presença ou ausência de seleção (LARTIGUE et al., 2002).

A presença de fragmento de 163 pb da oriC de *S. citri* (composta por três regiões DNA-box e dois grupos AT) é suficiente para conduzir a replicação de um vetor oriC em *S. citri* e reduzir a frequência de recombinação homóloga na região oriC. A partir destes dados, a inativação do gene de motilidade (*scmI*) de *S. citri* foi obtida com o plasmídio oriC pCL2. Apesar de ocorrer recombinação no sítio específico, pequena quantidade de plasmídio livre foi encontrada nas células transformadas sendo responsável pelo fenótipo de motilidade observado em alguns transformantes (LARTIGUE et al., 2002). Dados deste estudo são importantes para organismos nos quais a proteína RecA está ausente, como no caso de *S. citri*, reduzindo as chances de eventos de recombinação, pois corroboram para a hipótese de que o uso de vetor replicativo e o número de cópias do vetor aumentam as oportunidades de recombinação (LARTIGUE et al., 2002)

Outro plasmídio oriC de *S. citri* (pOT1) contém o gene *tetM* e foi introduzido em células de *S. citri* por eletroporação. Este plasmídio foi capaz de replicar em *S. citri* e se

manter estável como um elemento extracromossomal. Por conter também a origem de replicação cromossomal de *E.coli* este plasmídeo é um vetor *shuttle*, no entanto após algumas passagens em *S. citri* ele perde esta habilidade por ocorrer sua integração ao genoma da célula hospedeira. Dois genes heterólogos, gene da espiralina de *S. phoeniceum* e fragmento G do gene P1 de *M. pneumoniae*, clonados no vetor pOT1 foram introduzidos em *S. citri*. Os dois genes foram transcritos e o gene da espiralina foi expresso em *S. citri* (RENAUDIN et al., 1995).

Vetores oriC têm sido utilizados para expressão de genes heterólogos como *tetM*, *lacZ* e gene de *S. citri* que codifica a proteína espiralina em *M. capricolum* subsp *capricolum* e *M. agalactiae* (JANIS et al., 2005; CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005a).

Também foi obtida inativação do gene *lppA* de *M. capricolum* subsp *capricolum* direcionada pelo plasmídeo com oriC de *S. citri* (JANIS et al., 2005).

1.16 - Resistência à Tetraciclina

A maioria dos estudos de transferência gênica em mollicutes tem utilizado como marcadores de seleção o determinante de resistência à tetraciclina (TetM) encontrado no Tn916 ou determinante de resistência à gentamicina do Tn4001. O gene de *tetM* é utilizado preferencialmente como marcador de seleção, uma vez que, em geral, os mollicutes são sensíveis ao antimicrobiano tetraciclina enquanto nem todos mollicutes são sensíveis à gentamicina (RAZIN et al., 1998). Vicca et al. (2004) estudaram 21 linhagens de *M. hyopneumoniae* isoladas de rebanhos suínos da Bélgica e não encontraram resistência adquirida aos antimicrobianos oxitetraciclina e doxitetraciclina em nenhum destes isolados.

O marcador *tetM* confere alto nível de resistência a tetraciclina, mesmo se estiver presente em cópia única no genoma do micoplasma (DYBVIK & VOELKER, 1996).

O antimicrobiano tetraciclina liga-se à subunidade 30S ribossômica e impede interação do aminoacil-tRNA ao sítio A, bloqueando a síntese protéica e impedindo a multiplicação bacteriana (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A resistência à tetraciclina mediada pelo gene *tetM* ocorre pela ligação da proteína TetM ao ribossomo impedindo a inibição da síntese protéica pelo antibiótico (RASMUSSEN et al., 1994).

A seqüência de aminoácidos da proteína TetM de *Streptococcus faecalis* é estreitamente relacionada com a de TetM de *Ureaplasma urealyticum* (BURDETT, 1990). O gene *tetM* de *U. urealyticum* contém 4 códons TGG que codificam triptofano, garantindo a utilização do códon universal ao invés do códon de terminação TGA que em micoplasmas codifica triptofano (SANCHEZ-PESCADOR et al., 1988).

1.17 - Sistemas “Reporter”

Três sistemas repórter podem ser utilizados em micoplasmas: β -galactosidase (*lacZ*), GFP (*Green Fluorescent Protein*) e TetM.

O sistema repórter baseado no gene *lacZ* está estabelecido para diversas espécies de Mollicutes, tais como *M. gallisepticum*, *Acholeplasma* sp (KNUDTSON & MINION, 1993), *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. capricolum* e *M. arthritidis* (HALBEDEL & STÜLKE, 2006).

O sistema GFP mostrou-se eficiente para identificação de regiões promotoras de *M. genitalium* e *M. pneumoniae* clonando fragmentos destes micoplasmas em vetores e transformando em *E. coli*. (DHANDAYUTHAPANI et al., 1998).

1.18 - Regiões promotoras

O seqüenciamento completo do genoma de diversas espécies de micoplasmas focou a atenção no estudo do controle da expressão gênica nestas bactérias.

A identificação de regiões promotoras em micoplasmas é dificultosa considerando que as regiões intergênicas nos genomas de *M. hyopneumoniae* apresentam alto conteúdo de A+T (aproximadamente 80%) em comparação às seqüências codificantes (aproximadamente 70%) e que recentemente foi relacionado alto conteúdo de AT em regiões montante aos códons de iniciação da tradução (VASCONCELOS et al., 2005).

A falta desta informação prejudica a interpretação dos dados obtidos com o seqüenciamento do genoma. A identificação da região de início da transcrição para um grande número de genes permite a comparação da região imediatamente à montante destes genes e a identificação de seqüências consenso. Uma vez tendo esta informação, a análise de genes coordenadamente regulados pode permitir a identificação de características das regiões promotoras as quais contribuem para o controle da expressão (WEINER III et al., 2000).

Poucas regiões promotoras têm sido identificadas e analisadas em micoplasmas (MUSATOVOVA et al., 2003; WALDO et al., 1999; WEINER III et al., 2000) e estes estudos identificaram seqüências consenso bastante conservadas na região -10. No entanto, somente seqüências pouco conservadas na região -35 (VASCONCELOS et al., 2005). Na busca por sinais regulatórios montante às CDSs foram encontrados 17 *clusters*, representando uma pequena fração das CDSs do genoma de *M. hyopneumoniae* (70 CDSs) (VASCONCELOS et al., 2005).

Weiner III et al. (2000) identificaram em *M. pneumoniae* apenas 10 regiões de iniciação da transcrição (16S RNAr, 4,5S RNAr, 10S RNAr, operon P1, gene que codifica P65, gene que codifica proteína de superfície de 116 kDa e outros quatro localizados no gene *hmw*).

Dhandayuthapani et al. (1998) identificaram regiões promotoras de *M. genitalium* e *M. pneumoniae* clonando fragmentos destes micoplasmas em vetor com sistema repórter GFP e transformando em *E.coli*.

A detecção de regiões promotoras, assim como a determinação de padrões que eles apresentam, através de bioinformática tem atraído a atenção de pesquisadores nos últimos anos (KIM & SIM, 2005). No entanto, os mais recentes algoritmos não levam em conta o contexto biológico. Particularmente, a interação entre diferentes sítios regulatórios e propriedades estruturais do DNA permanecem impossíveis de integrar os atuais esquemas algoritmos (KIM & SIM, 2005).

A recente caracterização de fatores que influenciam a curvatura do DNA nos sítios de regulação da transcrição e a análise da desestabilização por estresse mecânico da fita dupla de DNA (SIDD - *stress-induced DNA duplex destabilization*) podem contribuir para o refinamento dos algoritmos utilizados para predição de genes e regiões promotoras (WANG et al., 2004; WANG et al., 2006; KOZOBAY-AVRAHAM et al., 2006)

A grande quantidade de dados disponíveis para *E. coli* tem sido utilizada para derivar matrizes com o objetivo de valorar cada base de potenciais seqüências promotoras. O ajuste da matriz para o conteúdo G+C do cromossomo em análise é uma adaptação indispensável para sua utilização em diferentes espécies de bactérias (WEINER III et al., 2000).

Em anotações do genoma de *M. hyopneumoniae* apenas um fator sigma pôde ser identificado, apresentando alta similaridade com fator sigma 70 de *E.coli* (VASCONCELOS et al., 2005). Weiner III et al. (2003) e Madsen et al. (2006a) identificaram um grande número de genes de *M. pneumoniae* e *M. hyopneumoniae* que são expressos em diferentes níveis em condições de choque térmico, revelando que de fato existe regulação da transcrição nestes organismos. Em outro estudo do transcriptoma de *M. hyopneumoniae* foram identificados 27 genes diferentemente expressos em resposta à condição de depleção de ferro durante a multiplicação deste organismo (Madsen et al., 2006b).

A análise molecular do mecanismo regulatório da transcrição em *M. hyopneumoniae* ainda não é possível devido à ausência de sistemas repórter adequados que possam ser utilizados para o estudo da atividade de regiões promotoras *in vivo*.

1.19 - Objetivos

Construção de vetor oriC de *M. hyopneumoniae* que seja um plasmídeo replicativo e estável em *M. hyopneumoniae*.

Estabelecer protocolo de eletrotransformação de *M. hyopneumoniae*.

2- Manuscrito parcial a ser submetido à publicação em revista científica.

Mycoplasma hyopneumoniae Transformation with a New Replicative Vector

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae causes important respiratory disease in swine, but little is known about its mechanisms of pathogenesis. The availability of molecular genetic tools is a prerequisite for investigating the biology of pathogenic bacteria. In contrast to the large data extracted from the analysis of complete genome sequences of two pathogenic and one non-pathogenic strain there is still a lack of efficient genetic tools for functional genomics of this bacterium. Recently, artificial plasmids based on the chromosomal origin of replication were obtained for several mollicutes species that have shown to be amenable to transformation. In order to develop a genetic system for analysis of potential virulence factors of *M. hyopneumoniae* an oriC plasmid was constructed. This is the first report that demonstrates the amenability of *M. hyopneumoniae* to transformation and functionality of heterologous *tetM* determinant in this pathogen.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, electroporation, oriC plasmids, tetracycline

Introduction

Mycoplasma hyopneumoniae is an animal pathogenic bacterium belonging to the class *Mollicutes*, a group of microorganisms phylogenetically related to low G-C content Gram-positive bacteria (RAZIN et al., 1998). *M. hyopneumoniae* is highly infective for swine and is the causative agent of enzootic pneumonia (EP), a disease characterized by sporadic, dry and non-productive cough, retarded growth and inefficient food conversion (MAES et al., 1996). Like most other members of the order *Mycoplasmatales*, *M. hyopneumoniae* is infective for a single host species, but the mechanisms of host specificity are unknown. This organism has a worldwide

distribution and occurs in almost every herd. Relative control has been achieved through active vaccination programs, but porcine enzootic pneumonia continues to be one of the major economic problems in the swine industry (MINION et al., 2004).

To date three strains of *M. hyopneumoniae*, two pathogenic (7448, 232) and one non-pathogenic (ATCC 25934), have been sequenced (VASCONCELOS et al., 2005; MINION et al., 2004). Very little is understood of the structure of mycoplasma promoters, and this limits the interpretation of genomic sequence data in these species (WEINER III et al., 2000). There is a lot yet to be learned about gene expression regulation in *M. hyopneumoniae* to understand the process of adaptation of the organism to changing environmental conditions (WEINER III et al., 2003).

The prediction of promoters by current bioinformatics tools is difficult considering the weak -35 consensus and higher A+T content of intergenic regions in the *M. hyopneumoniae* genomes than coding sequences (WEINER III et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2005). It has been lately shown that AT content is higher in the 200 bp upstream of translation start codons than in the 200 bp downstream (VASCONCELOS et al., 2005).

The detection of promoters in genomic DNA sequences, as well as the determination of significant patterns they harbor, via computational methods has attracted considerable research attention in recent years (KIM & SIM, 2005). However the latter algorithms cannot take biological context into account. In particular, interaction between different regulatory sites, and structural properties of DNA, remain impossible to integrate into current algorithmic schemes (KIM & SIM, 2005).

Recently characterization of the factors influencing curved DNA at the regulation sites of transcription and analysis of stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) can greatly improve the currently available promoter and gene prediction algorithm (WANG et al., 2006a; WANG et al., 2006b; KOZOBAY-AVRAHAM et al., 2006).

In annotations of the *M. hyopneumoniae* genomes, only one sigma factor could be identified. The strongest similarity was found in a protein (MHP0063) to sigma-70 factor and sigma-32 factor of *E.coli* (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005). However, WEINER III et al. (2003) have identified several genes which were up- and down-regulated during heat shock conditions in *M. pneumoniae* showing that transcription regulation do exist in this organism.

The molecular analysis of transcription regulatory mechanisms in *M. hyopneumoniae* has so far been difficult due to the lack of appropriate reporter systems that can be used to study the activity of promoter fragments in vivo.

While progress has been made in understanding the molecular basis for some mycoplasma diseases, *M. hyopneumoniae* has resisted advances because of its fastidious growth in liquid and solid media, and the lack of genetic tools (MINION et al., 2004).

The majority of genetic tools and transformation protocols which are well-established in model organisms such as *B. subtilis* or *E. coli* are unavailable for mycoplasmas (HALBEDEL & STÜLKE, 2006; MINION et al., 2004). Only two transposons have been used in mycoplasmas, Tn916 e Tn4001, both from gram-positive organisms (POUR-EL et al., 2002).

Most studies on gene transfer in mollicutes have used as selectable marker the *tetM* tetracycline resistance determinant found on Tn916, since mollicutes in general are sensitive to tetracycline (RAZIN et al., 1998).

The use of replicative plasmids in mycoplasmas is restricted to *M. pulmonis* (CORDOVA et al., 2002), *M. agalactiae* (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (JANIS et al., 2005; LARTIGUE et al., 2003), *M. mycoides* subsp. *mycoides* large colony and *M. mycoides* subsp. *mycoides* small colony (LARTIGUE et al., 2003).

The aim of the present study was to develop a genetic system for analysis of promoter sequences of *M. hyopneumoniae* and demonstrate the ability to transform this organism. *M. hyopneumoniae* was chosen because its importance to swine production.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and enzymes

Escherichia coli XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacI^qZ.M15* Tn10 (Tet^r)] (Stratagene™) was used as the host strain for cloning experiments and plasmid propagation. For plasmid transformation, *E. coli* competent cells were prepared according to the procedure described by Sambrook & Russell (2001).

Mycoplasma hyopneumoniae strain 7448 was originally isolated from an infected swine in Lindóia do Sul, Santa Catarina, Brazil. When inoculated in specific pathogen free (SPF) pigs, this strain caused disease and consistently produced the characteristic symptoms of EP (VASCONCELOS et al., 2005).

Plasmid vectors pAM120 (GAWRON-BURKE & CLEWEL et al., 1984), pSRT1 (LARTIGUE et al., 2002), and pOSTM were maintained and multiplied in *E. coli* XL1-Blue cultivated in Luria-Bertani broth supplemented with 50 µg/mL of ampicilin.

Enzymes for molecular biology were purchased from Invitrogen™ and Fermentas, and were used with the supplied buffers.

Primers and PCR amplification

Primers SPIR/PstI-UP and SPIR/SalI-DO corresponding, respectively, to bases 4154-4171 and 4483-4466 of the published sequence (GenBank accession No. [AF012877](#)) were used to amplify the promoter of the *Spiroplasma citri* spiralin gene from the plasmid pSRT1. The *tetM* gene was amplified from plasmid pAM120 (GenBank accession No. [U49939](#)) with primers TETM/Bam-DO and TETM/SalI-UP. These primers correspond, respectively, to bases 15385-15362 and 13467-13490 of the nucleotide sequence of the Tn916 *tetM* gene. Primers MH_ORI-UP and MH_ORI-DO correspond, respectively, to bases 1-30 and 1700-1671 of the nucleotide sequence of *M. hyopneumoniae* *oriC* region (GenBank accession No. [NC_007332](#)) Amplification was carried out in 25 µL reaction mixture containing 5-10 ng of target DNA and 1U of Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen™) with the 1X buffer recommended by supplier, 5mM dNTPs, 2.5mM MgCl₂ and 30 pmol of each primer. Amplification was achieved in over 35 cycles, each of 45 s at 94°C, 45 s at the annealing temperature and 2 minutes or 50 s at 72°C.

Table 1 - Primers sequence, annealing temperature, extension time and size of amplicon.

Primers	Sequence	Annealing temp.	72°C extension step	Size of amplicon (bp)
SPIR/PstI-UP	5' CTG CAG CAG AAT TAA AAG TTA GTG 3'	50 °C	50 seconds	342
SPIR/SalI-DO	5' GTC GAC TTC ATT TCT TAT ATT TCC 3'	50 °C		
TETM/SalI-UP	5' GTC GAC ATG AAA ATT ATT AAT ATT GGA GTT T 3'	66 °C	2 minutes	1917
TETM/Bam-DO	5' GGA TCC CTA AGT TAT TTT ATT GAA CAT ATA 3'	66 °C		
MH_ORI-UP	5' TTT TTC TCC TTT TTT TGC TTA AAT TTA AGT 3'	50 °C	2 minutes	1700
MH_ORI-DO	5' TTT AGT TTT AAT AAT AAA AAT AAT AAG GCT 3'	50 °C		

Plasmid constructions

Plasmid pOM was obtained by inserting the oriC, 1700 bp PCR product, at the SmaI site of pUC18 vector (Stratagene™) (Fig.1A). To construct pSM, the spiralin gene promoter was PCR-amplified from pSRT1 with primers SPIR/PstI-UP and SPIR/SalI-DO, and the 342 bp was inserted into the SmaI site of pUC18. After restriction by PstI and SalI, the 342 bp fragment was inserted into the PstI/SalI sites of pOM to yield pOSM (Fig1.B).

The tetM gene was amplified from pAM120 with primers TETM/SalI-UP and TETM/Bam-DO and inserted into the SmaI site of pUC18. After restriction by SalI and BamHI, the 1917 bp fragment was inserted into BamHI/SalI sites of pOSM to yield the oriC vector pOSTM (Fig1.C). Correct cloning was confirmed by DNA sequencing of all fragments cloned.

In the plasmid vector pOSTM, the *M. hyopneumoniae* oriC region comprises the *dnaA* gene, the upstream region of *dnaA* gene with two DnaA box, and the *dnaA-dnaN* intergenic region reported as essential for plasmid replication in *S. citri* (LARTIGUE et al., 2002). The *tetM* gene expression is driven by the *S. citri* spiralin gene promoter.

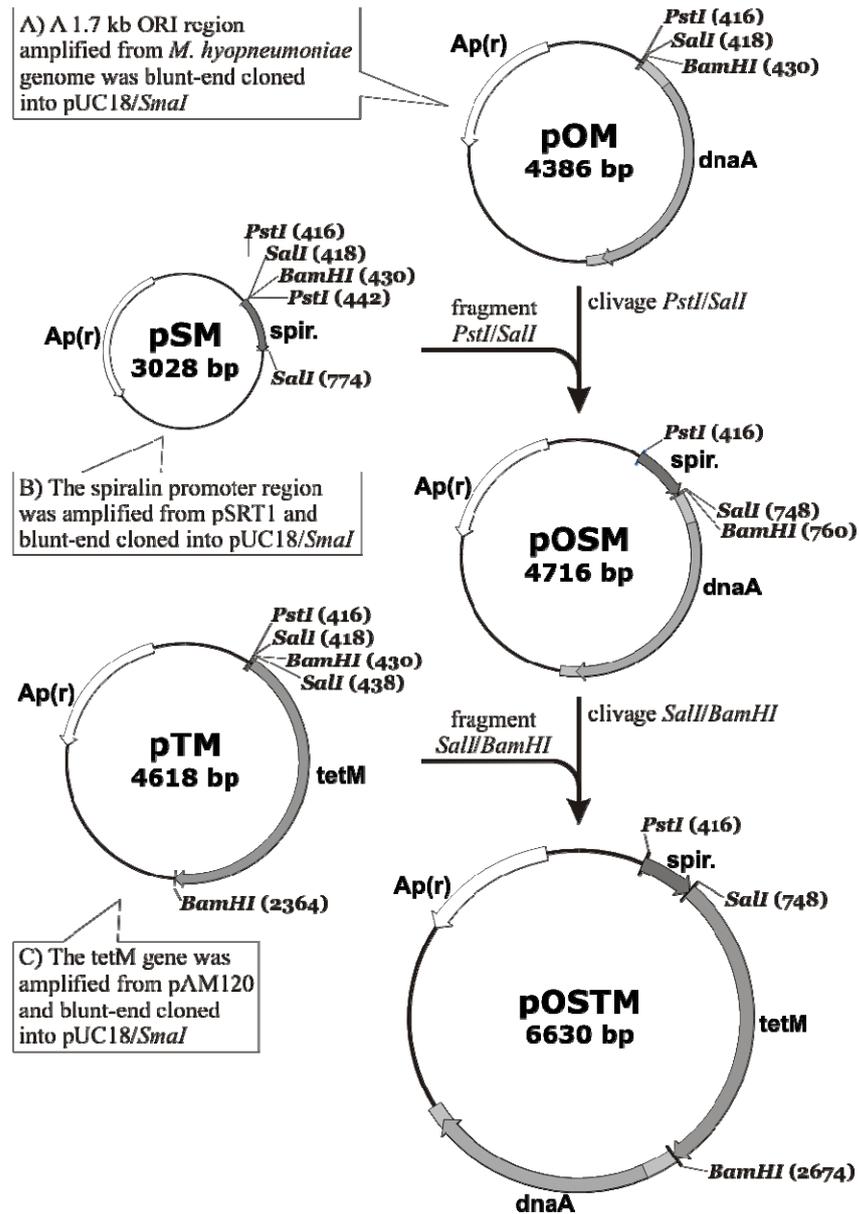


Figure 1 - Construction and restriction maps of plasmids pOM, pSM, pTM and pOSTM. Abbreviations: tetM, tetracycline resistance gene; spir., promoter region of the *S. citri* spiralin gene; Ap(r), pUC18 ampicilin resistance gene; ORI, chromosomal replication origin from *M. hyopneumoniae*.

Transformation

Electrotransformation of *M. hyopneumoniae* with pOSTM was initially based on methods previously described for other *Mycoplasma* species (MINION & KAPKE, 1998, CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005) but were later modified to best suit *M. hyopneumoniae*.

Isolation and cultivation were performed in standard conditions, as described by FRISS (1975), with cells grown in 60 mL of medium, until a density corresponding to 10^8 CFU/mL. Cells were harvested by centrifugation at $3360 \times g$ for 30 minutes and washed one time with the original volume of electroporation buffer - EB (272 mM sucrose, 8 mM HEPES, pH 7.4) before final resuspension in 300 μ l of EB. Electrotransformation of *M. hyopneumoniae* with plasmid DNA was carried out with 10 μ g or 7.5 μ g of DNA.

The DNA-cell mixture was allowed to stand on ice for 15 minutes, transferred to pre-chilled 2 mm electrocuvettes and then electroporated in a BIO-RAD Gene-Pulser^R apparatus. The electroporation conditions using 2,5kV voltage, 25 μ F capacitance and 400 Ω resistance, were found to be most suitable and the pulse length varied from 4.8 to 5.5 milliseconds.

After the electric pulse, 900 μ l of chilled Friis broth was added and cells were kept at 37°C for 3 h to express tetracycline resistance.

Transformants were selected on liquid or/and solid Friis medium supplemented with 2 μ g of tetracycline per mL. Preliminary experiments had indicated that no spontaneous resistance to tetracycline occurs naturally in *M. hyopneumoniae*. The plates were examined up to a maximum of 10 days using magnifying glass and colonies were picked in 100 μ L of Friis broth containing 2 μ g/mL of tetracycline for further analysis.

To confirm the presence of plasmid pOSTM in the *M. hyopneumoniae* PCR was performed. The PCR primers SPIR/PstI-UP and SPIR/SalI-DO were used to screen for the spiralin promoter in the plasmid. Crude DNA extracts were obtained by boiling 100 μ l of cultures or colony transformants for ten minutes. PCR assays were conducted using 5 μ l of the crude DNA as template in 25 μ l reaction mixtures, with 1 U of Taq DNA polymerase (Cenbiot-UFRGS) in 1X buffer supplied by the manufacturer, 5 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ and 30 pmol of each primer.

Results

Tetracycline-resistant (tetR) colonies appeared within 10 days of incubation (Figure 2). The transformation frequency of the pOSTM was 42.6 and 37.9 cfu transformants/ μg for two independent electroporation events with 10 and 7.5 μg of DNA respectively. At that time, no spontaneous tetR colonies were observed for untransformed controls. Individual mycoplasma colonies were selected for further study in order to confirm the presence of plasmid pOSTM in the *M. hyopneumoniae*. Individual transformants were picked from selective agar plates using sterile Pasteur pipettes and transferred to 100 μL of Friis broth containing 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tetracycline and 100 μL Friis broth without antibiotic to test the stability of the vector, but no growth was observed in both media.

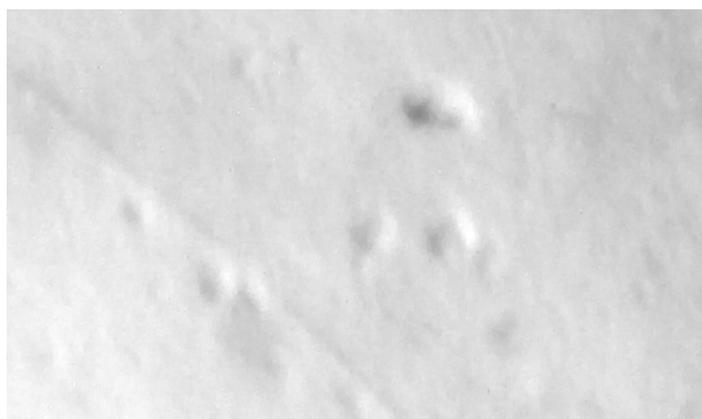


Figure 2 – Colonies of *M. hyopneumoniae* strain 7448 transformed with pOSTM and grown in agar Friis medium with tetracycline (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), visualized with a magnifying glass (50X).

Transformants selected on liquid Friis medium were propagated in the presence of tetracycline for up to two passages.

The promoter was amplified indicating that the vector had inserted into the organism (Figure 3).

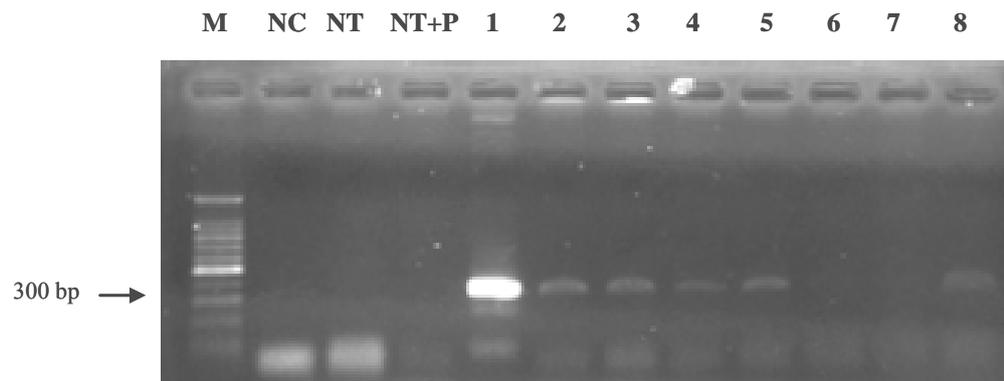


Figure 3 – Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from tetracycline-resistant clones of *M. hyopneumoniae*.

PCR products were obtained using primers SPIR/PstI-UP and SPIR/SalI-DO to detect the presence of pOSMT in the different clones. M, 100 bp DNA ladder; NC, PCR negative control; NT, PCR negative control added with DNA extracted from nontransformed *M. hyopneumoniae* cells; NT+P, PCR reaction carried out with DNA obtained from *M. hyopneumoniae* cells mixed with 10 µg of the pOSTM plasmid and incubated for 10 days; lane 1, PCR positive control; lanes 2 to 7, PCR products amplified from total DNA from six *M. hyopneumoniae* colonies transformed with pOSTM; lane 8, PCR product amplified from total DNA from *M. hyopneumoniae* transformed with pOSTM and cultivated in Friis broth (second passage);

Discussion

As expected transformants grown at low tetracycline concentration (2 µg/mL) were found after 10 days of incubation, suggesting that the *tetM* gene could be transcribed from DNA sequence carried on the spiralin gene fragment and recognized by the RNA polymerase. It should be noticed that even so transformation frequency could not be compared to previous studies with Mycoplasmas, since they determined the efficiency by transformants/cfu/µg plasmid DNA (JANIS et al., 2005; LARTIGUE et al., 2003), we considered to our data low efficiency.

The findings of our study have evidenced that *M. hyopneumoniae* is amenable to transformation by electroporation and that the *tetM* gene and the promoter of spiralin gene are functional in this organism.

It is known that in *B. subtilis*, *dnaA* box regions are incompatible so that oriC plasmids can exist in only one copy and overexpression of the DnaA protein inhibits initiation of DNA replication and cell division (RENAUDIN et al. 1995). Such an incompatibility in *M. hyopneumoniae* would explain the difficulty to grow the transformants after two passages.

This plasmid is of particular interest because *M. hyopneumoniae* causes important economic losses in swine production and development of new vaccines against this agent is considered to be an international priority. The complete genome sequence of three strains are available and genomic comparisons studies among pathogenic and non-pathogenic strains have been described genes potentially related to virulence and a few number of genes involved in regulation of gene expression (MADEIRA & GABRIEL, 2007; FERREIRA & CASTRO, 2007).

The pOSTM can serve as a valuable tool to genetically manipulate *M. hyopneumoniae* to identify and study the factors involved in their virulence and pathogenicity. The experimental approach to test putative promoters and the importance of the -35 region is now likely to be possible since a reporter system is now available for *M. hyopneumoniae*.

In conclusion, our study is the first report of construction and testing of oriC vector for transformation of *M. hyopneumoniae* (7448).

REFERENCES

- CHEVALIER, C., SAILLARD, C. & BOVE, J.M. Organization and nucleotide sequences of the *Spiroplasma citri* genes for ribosomal protein S2, elongation factor Ts, spiralin, phosphofructokinase, pyruvate kinase, and an unidentified protein. **Journal of Bacteriology**, v.172, p 2693-2703, 1990.
- CHOPRA-DEWASTHALY, R. et al. Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.253, p.89-94, 2005.
- CORDOVA, C.M. et al. Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in oriC replicative plasmids. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.5426-5435, 2002.
- FERREIRA, H.B. & DE CASTRO, L.A. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 245-255, 2007.
- FRIIS, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk Veterinaer Medicin*, v. 27, p.337-339, 1975.
- GAWRON-BURKE, C & CLEWEL, D.B. Regeneration of insertionally inactivated streptococcal DNA fragments after excision of transposon Tn916 in *Escherichia coli*: strategy for targeting and cloning of genes from gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p.214-221, 1984
- HALBEDEL, S. & STULKE, J. Probing in vivo promoter activities in *Mycoplasma pneumoniae*: a system for generation of single-copy reporter constructs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1696-1699, 2006.
- JANIS, C. et al. Versatile use of oriC plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2888-2893, 2005.
- KIM, K.B. & SIM, J.S. Computational detection of prokaryotic core promoters in genomic sequences. **Journal of Microbiology**, v.43, p.411-416, 2005.
- KOZOBAY-AVRAHAM, L.; HOSID, S. & BOLSHOY, A. Involvement of DNA curvature in intergenic regions of prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, v.34. p.2316-2327, 2006.
- LARTIGUE, C. et al. New plasmid vectors for specific gene targeting in *Spiroplasma citri*. **Plasmid**, v.48, p.149-159, 2002.
- LARTIGUE, C. et al. Host specificity of mollicutes oriC plasmids: functional analysis of replication origin. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.6610-6618, 2003.

MADEIRA, H.M.F. & GABRIEL, J.E. Regulation of gene expression in Mycoplasmas: Contribution from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae* genome sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 277-282, 2007.

MADSEN, M.L. et al. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. **Infection and Immunity**, v.74, p. 160-166, 2007a.

MADSEN, M.L. et al. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. **Microbiology**, v.152, p. 937-944, 2006b.

MAES, D.; VERDONCK, M. & DELUYKER, H. de KA. Enzootic pneumonia in pigs. **Vet Q**, v.18, p.104-109, 1996.

MINION, F.C. & KAPKE, P.A. Transformation of mycoplasmas. **Methods in Molecular Microbiology**, v.104, p.227-234, 1998.

MINION, F.C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v.18, p.7123-7133, 2004.

POUR-EL, I.; ADAMS, C. & MINION, F.C. Construction of mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*. **Plasmid**, v.47, p.129-137, 2002.

RAZIN, S.; Yogev, D. & Naot, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.62, p.094-156, 1998.

RENAUDIN, J. et al. Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.2870-2877, 1995.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbour, 2001. 3v

VASCONCELOS, A.T. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5568-5577, 2005.

WANG, H.; NOORDEWIJER M. & BENHAM, C.J. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the *E. coli* genome: SIDD sites are closely associated with promoters. **Genome Research**, v.14, p.1575-1584, 2004.

WANG, H.; KALOPER, M. & BENHAM, C.J. SIDDBASE: a database containing the stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) profiles of complete microbial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.D373-D378, 2006.

WEINER III, J.; HERRMANN R. & BROWNING, G.F. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.28, p.4488-4496, 2000.

WEINER III, J. et al. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.6306-6320, 2003.

2- DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi desenvolvido o primeiro vetor replicativo para transformação da bactéria *M. hyopneumoniae* linhagem 7448, uma ferramenta importante para estudos genéticos deste agente da PE.

Uma falha na construção do vetor pOSTM foi identificada após o seqüenciamento parcial deste plasmídio, o qual revelou a ausência do nucleotídio adenosina no iniciador TETM/Sall-UP. Tal erro implica na perda do códon de iniciação da tradução (ATG) do gene *tetM*, presente no vetor pOSTM.

A resistência à tetraciclina foi utilizada neste vetor como marca de seleção das colônias transformantes, logo a falta da expressão da proteína codificada pelo gene *tetM* é vista como um problema para a manutenção do plasmídio no interior da célula hospedeira e a seleção dos organismos transformantes.

Todavia, a observação de colônias transformantes em meio seletivo com antibiótico evidenciou que a expressão do gene que confere resistência à tetraciclina ocorria naquelas células de *M. hyopneumoniae* contendo o vetor pOSTM. A presença destas colônias transformantes em meio contendo 2 µg/mL de tetraciclina foi confirmada por amplificação de uma porção da região ribossômica 16S de *M. hyopneumoniae* e da seqüência promotora do gene da espiralina (APÊNDICE B), com iniciadores específicos já descritos.

A tradução do gene *tetM* neste vetor faltando o códon de iniciação pode ser explicada quando analisamos os códons alternativos de iniciação presentes na seqüência promotora do gene da espiralina e na própria seqüência nucleotídica do gene (APÊNDICE C). Tal análise foi realizada pelo programa *Virtual Ribosome* (WERNERSSON et al., 2006), utilizando a tabela de código genético de micoplasma e espiroplasma (tabela 4), o qual identificou as trincas TTG e GTG como possíveis códons alternativos de iniciação, previamente descritos como funcionais em *M. hyopneumoniae* (SOUTHERN GENOME INVESTIGATION PROGRAM, 2007).

A cada evento de transformação um baixo número de *M. hyopneumoniae* resistentes à tetraciclina foi obtido em relação à quantidade de DNA e ao número de UFC viáveis após a transformação. Esta baixa eficiência de transformação foi constatada em sucessivas transformações e diferentes protocolos testados, e poderia ser o reflexo do baixo nível de expressão do gene de resistência à tetraciclina.

O códon ATG na região de início da tradução interage mais fortemente com o RNAt iniciador em relação a outros códons iniciadores (SAKAI et al., 2001), dado que corrobora com a idéia de que a tradução do transcrito do gene *tetM* é menos eficiente devido à utilização de um códon alternativo. Uma explicação parcial para esta menor eficiência é o pareamento fraco de duas bases ao invés das três bases AUG com o RNAt^{fMet} (KOZAK, 2005). E outro agente responsável por esta característica é o fator de iniciação IF3, presente em genomas procariotos e no genoma de *M. hyopneumoniae*, o qual tem a função de desfavorecer o início da tradução a partir de códons alternativos (KOZAK, 2005).

A utilização do códon de iniciação alternativo TTC obrigatoriamente impediria a ligação do ribossomo ao sítio RBS do promotor localizado à jusante a esta trinca (CHEVALIER et al, 1990). No entanto, foi observada a ausência de região 5' não traduzida contendo a seqüência RBS em uma grande quantidade de transcritos de *M. pneumoniae* (WEINER III et al., 2003). Dessa forma, é possível considerarmos a tradução deste transcrito sem o reconhecimento direto do RNAr 16S na seqüência RBS.

O erro identificado foi corrigido através da amplificação do gene *tetM* com um novo iniciador (5' GTC GAC ATG AAA ATT ATT AAT ATT GGA GTT T 3') e posterior clonagem no vetor pOSM. Os resultados apresentados neste trabalho referem-se à utilização deste novo vetor pOSTM corrigido para transformação de *M. hyopneumoniae*.

O gene *tetM* mostrou ser uma marca de seleção eficaz neste organismo e um possível sistema repórter para análise de regiões regulatórias da transcrição de genes.

O vetor construído neste trabalho foi utilizado para experimento de eletrotransformação em *M. hyopneumoniae*. Os resultados deste estudo são os primeiros relatados até o momento para *M. hyopneumoniae* e a metodologia descrita ainda não corresponde às condições ideais de eletroporação para este organismo.

Não foi possível comparar a eficiência de transformação de nosso estudo com os dados relatados para *M. agalactiae*, *M. capricolum* e *S. citri* (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005 a; JANIS et al., 2005; LARTIGUE et al., 2002), uma vez que estes utilizaram a relação entre número de transformantes, número de células e µg de DNA plasmidial, enquanto em nosso trabalho determinamos o número de transformantes obtidos em relação a 1 µg de DNA plasmidial.

Apesar de uma baixa freqüência de transformantes ser um resultado esperado para mollicutes, se faz necessário aprimorar a metodologia empregada para aumentar a

taxa de sobrevivência das células à descarga elétrica e garantir a replicação do vetor em *M. hyopneumoniae* ao longo de sucessivas passagens em meio seletivo. Em outros estudos de transformação em mollicutes a região oriC promoveu a replicação estável do plasmídio dentro da bactéria em *Spiroplasma citri* (YE et al, 1994), *M. pulmonis* (CORDOVA et al, 2002), *M. mycoides* (LARTIGUE et al, 2003), *M. capricolum* (JANIS et al, 2005) e *M. agalactiae* (CHOPRA-DEWASTHALY et al, 2005 a).

A ausência de multiplicação de transformantes após a segunda passagem em meio Friis seletivo expõe a presente dificuldade de manutenção da marca de seleção do vetor dentro da célula hospedeira. A ocorrência de integração do plasmídio no cromossomo, a instabilidade do vetor, a presença em duplicata da região oriC ou a morte de células transformantes após um período prolongado de cultivo poderiam ser explicações para a perda precoce destes transformantes e devem ser analisadas.

Neste estudo não foi investigada a possibilidade de integração do vetor oriC no cromossomo de *M. hyopneumoniae*. Este evento é passível de ocorrer, visto que estudos de transformação em mollicutes relatam a integração do plasmídio no cromossomo do hospedeiro através de recombinação homóloga na região oriC envolvendo um evento de *crossing over* (LARTIGUE et al., 2002; RENAUDIN et al., 1995).

Sendo confirmada esta hipótese, uma maneira de evitar a integração e promover a replicação do vetor é a redução do tamanho da origem de replicação de *M. hyopneumoniae* a um tamanho mínimo necessário para a replicação (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2005a). A retirada do gene *dnaA* do vetor pOSTM é uma estratégia interessante, pois em *S. citri* a pequena a região intergênica *dnaA-dnaN* de 163 pb (contendo três regiões DNA-*box*) foi suficiente para a manutenção da replicação do vetor pCL2 (LARTIGUE et al., 2002). Em *M. hyopneumoniae* foram encontradas seqüências DnaA-*box* somente na região intergênica à montante do gene *dnaA*. Na região entre os genes *dnaA* e *dnaN* foram encontradas estas seqüências DnaA-*box* apenas quando utilizados consensos menos específicos, comprometendo a confiabilidade da seqüência identificada (MINION et al., 2004). Dessa forma, manter as regiões que flanqueiam o gene *dnaA* no vetor pOSMT garantiria a presença das seqüências DnaA-*box*, descritas como essenciais para replicação plasmidial em *M. pulmonis* (CORDOVA et al., 2002).

Em *B. subtilis* já foi descrita a incompatibilidade de regiões dnaA-*box* presentes no plasmídio replicativo e na oriC da bactéria. A superexpressão da proteína DnaA inibe a iniciação da replicação e divisão celular (RENAUDIN et al. 1995).

Desde a conclusão do seqüenciamento do genoma completo de três linhagens desta bactéria a atenção de diversos pesquisadores está direcionada para a compreensão dos mecanismos regulatórios de seus genes e para a identificação de proteínas com potencial imunogênico, importantes para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. O desenvolvimento de ferramentas genéticas que possibilitem os estudos *in vivo* e substituam os sistemas heterólogos de clonagem e expressão são importantes para a continuidade das pesquisas na área.

Em relação às aplicações do vetor pOSTM, além de ser uma promissora ferramenta para estudos de regiões promotoras, o mesmo pode ser utilizado para a identificação de função gênica.

Em estudos futuros, o sistema repórter *tetM* de pOSMT pode ser utilizado em análises sobre a importância da região promotora -35 para expressão gênica através da deleção desta seqüência consenso da região promotora e clonagem em pOSMT para transformação em *M. hyopneumoniae*.

O efeito da expressão de genes heterólogos, como por exemplo, na velocidade da multiplicação *in vitro* de *M. hyopneumoniae*, ou o efeito da superexpressão de genes sobre a característica de virulência são algumas das possíveis utilizações do pOSTM como vetor replicativo. A função de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade pode ser analisada quando inserimos mutações nestes genes candidatos e os introduzimos no vetor pOSTM. Após a transformação é possível analisar o efeito sobre o fenótipo dos transformantes.

Se considerarmos o uso de pOSTM como vetor integrativo, são possíveis estudos como inativação gênica específica por recombinação homóloga e geração de mutantes específicos de *M. hyopneumoniae*. Essa abordagem poderia ser conduzida através da clonagem do gene de interesse no vetor pOSTM (após mutagênese *in vitro*) e subsequente transformação em *M. hyopneumoniae*.

Por fim, nossos resultados permitem concluir que a espécie *M. hyopneumoniae* é susceptível de transformação artificial pela metodologia de eletroporação e que o gene heterólogo *tetM* presente no vetor pOSTM construído neste trabalho confere a característica de resistência ao antimicrobiano tetraciclina neste organismo.

3- PERSPECTIVAS

- Otimizar as condições de eletroporação a fim de obter uma maior taxa de sobrevivência das células eletroporadas e aumentar a eficiência de transformação.
- Determinar a concentração ótima de DNA do vetor que corresponda a uma maior frequência de transformantes.
- Verificar a estabilidade do vetor pOSTM em *M. hyopneumoniae* após passagens em meio Friis seletivo com concentrações crescentes de antibiótico.
- Verificar a ocorrência de integração por recombinação do pOSMT ao DNA cromossomal de *M. hyopneumoniae* por *Southern blot*.
- Utilizar o sistema construído para estudo das possíveis regiões promotoras encontradas no genoma de *M. hyopneumoniae* através de análise *in silico*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEPCS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. Informativo Abiepcs em Foco/ Fevereiro de 2004. Disponível em: <http://www.abiepcs.com.br/foco_44.pdf>. Acesso em: 29 de jul. 2005 a.

ABIEPCS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **Suinocultura Brasileira**. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/relatorios/ABIEPCS_relatorio_2006_pt.pdf>. Acesso em: 29 de jul. 2005 b.

ABIEPCS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **Suinocultura Brasileira**. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/relatorios/ABIEPCS_relatorio_2006_pt.pdf>. Acesso em: 19 de abr. 2007.

ANDRADA, M. et al. Patogênese, signos clínicos y lesiones de la neumonía enzoótica porcina. *Porci aula veterinária*, n. 74, p. 47-68, 2003 a.

ANDRADA, M. et al. Estratégias de intervención y coste de la neumonía enzoótica porcina. *Porci aula veterinária*, n. 74, p. 89-103, 2003 b.

BARCELLOS, D.E. Dinâmica da infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*: uma visão atual. In: I Simpósio UFRGS sobre produção, reprodução e sanidade suína. *Anais*. Porto Alegre, RS, p. 46-54, 2006.

BARROS, G.S.C. **Agronegócio Brasileiro - Perspectivas, desafios e uma agenda para seu desenvolvimento Julho, 2006**. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em: 18 de mar. 2007.

BAUMEISTER, A.K. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.1984-1988, 1998.

BOVE, J.M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. *Research in Microbiology*, v.150, p.239-245, 1999.

BURDETT, V. Nucleotide sequence of the tet(M) gene of Tn916. *Nucleic Acids Research*, v.18: p.6137, 1990.

CAO J.; KAPKE, P.A. & MINION, F.C. Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors. *Journal of Bacteriology*, v.176, p.4459-4462, 1994

CARON J.; OUARDANI, M. & DEA, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.1390-1396, 2000.

- CHOI, C. et al. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology*, v.134, p.40-46, 2006.
- CHOPRA-DEWASTHALY, R. et al. Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.253, p.89-94, 2005a.
- CHOPRA-DEWASTHALY, R. et al. First steps towards the genetic manipulation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* using the transposon Tn4001mod. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, p.447-453, 2005b.
- CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1034-1042, 2006.
- CORDOVA, C.M. et al. Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in oriC replicative plasmids. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.5426-5435, 2002.
- DE CASTRO, L.A. et al. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.258-269, 2006.
- DHANDAYUTHAPANI, S.; RASMUSSEN, W.G. & BASEMAN, J.B. Identification of mycoplasmal promoters in *Escherichia coli* using a promoter probe vector with Green Fluorescent Protein as reporter system. **Gene**, v.215, p.213-222, 1998.
- DHANDAYUTHAPANI, S.; RASMUSSEN, W.G. & BASEMAN, J.B. Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p. 5227-5232, 1999.
- DJORDJEVIC, S.P. et al. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. **Infection and Immunity**, v.72, p.2791-2802, 2004.
- DYBVIG, K. & VOELKER, L.L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.25-57, 1996.
- FAGAN, P.K. et al. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). **Infection and Immunity**, v.65, p.2502-2507, 1997.
- FAGAN, P.K. et al. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial Pathogenesis**, v.30, p.101-110, 2001.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The FAOSTAT ProdSTAT module for livestock**. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx>>. Acesso em: 7 de mar. 2007

FERREIRA, H.B. & DE CASTRO, L.A. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 245-255, 2007.

FOISSAC, X.; SAILLARD, C. & BOVE, J.M. Random insertion of transposon Tn4001 in the genome of *Spiroplasma citri* strain GII3. **Plasmid**, v.37, p.80-86, 1997.

FRIIS, N.F. **Mycoplasmas in pigs, with special regard to the respiratory tract**. Copenhagen, 1974. 162 p. Tese

HALBEDEL, S. & STULKE, J. Probing in vivo promoter activities in *Mycoplasma pneumoniae*: a system for generation of single-copy reporter constructs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1696-1699, 2006.

HALBEDEL, S. & STULKE, J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, p.37-44, 2007.

HEDREYDA, C.T.; LEE, K.K. & KRAUSE, D.C. Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation. **Plasmid**, v.30, p.170-175, 1993.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da Produção Pecuária - dezembro de 2006**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 7 de mar. 2007

JANIS, C. et al. Versatile use of oriC plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2888-2893, 2005.

KANNAN, T.R. & BASEMAN, J.B. Expression of UGA-containing *Mycoplasma* genes in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.2664-2667, 2000.

KIM, J.; CHUNG, H.K. & CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **Veterinary Journal**, v.166, p.251-256, 2003.

KIM, K.B. & SIM, J.S. Computational detection of prokaryotic core promoters in genomic sequences. **Journal of Microbiology**, v.43, p.411-416, 2005.

KING, K.W. & DYBVIG, K. Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *Mycoides* plasmid pKMK1. **Plasmid**, v.28, p.86-91, 1992

KING, K.W. & DYBVIG, K. Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMK1. **Plasmid**, v.31, p.49-59, 1994..

KNUDTSON, K.L. & MINION, F.C. Construction of Tn4001lac derivatives to be used as promoter probe vectors in mycoplasmas. **Gene**, v.137, p.217-222, 1993.

KOZAK, M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, v.361, p.13-37, 2005.

- KOZOBAY-AVRAHAM, L.; HOSID, S. & BOLSHOY, A. Involvement of DNA curvature in intergenic regions of prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.2316-2327, 2006.
- KURTH, K.T. et al. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.463-469, 2002.
- LARTIGUE, C. et al. New plasmid vectors for specific gene targeting in *Spiroplasma citri*. **Plasmid**, v.48, p.149-159, 2002.
- LARTIGUE, C. et al. Host specificity of mollicutes oriC plasmids: functional analysis of replication origin. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.6610-6618, 2003.
- MADEIRA, H.M.F. & GABRIEL, J.E. Regulation of gene expression in Mycoplasmas: Contribution from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae* genome sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 277-282, 2007.
- MAHAIRAS, G.G.; CAO, J.A. & MINION, F.C. Genetic exchange of transposon and integrative plasmid markers in *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.2267-2272, 1990.
- MAROIS, C. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.96-104, 2007.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Novos Tempos - A agropecuária no Brasil 2003-2006**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 7 de mar. 2007 b
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções do agronegócio: Mundial e Brasil – 2006/07 a 2016/17**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 7 de mar. 2007 a
- MATTSSON, J.G. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Nose Swabs from Pigs by In Vitro Amplification of the 16S rRNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p. 893-897, 1995.
- MEENS, J.; SELKE, M. & GERLACH, G.F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.85-95, 2006.
- MEYNS, T. et al. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. **Veterinary Microbiology**, v., p. 2006.
- MINION, F.C. & KAPKE, P.A. Transformation of mycoplasmas. **Methods in Molecular Microbiology**, v.104, p.227-234, 1998.

- MINION, F.C.; ADAMS, C. & HSU, T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. **Infection and Immunity**, v.68, p.3056-3060, 2000.
- MINION, F.C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v.18, p.7123-7133, 2004.
- MUDAHI-ORENSTEIN, S. et al. Cytadherence-deficient mutants of *Mycoplasma gallisepticum* generated by transposon mutagenesis. **Infection and Immunity**, v.71, p.3812-3820, 2003.
- MUSATOVOVA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. & BASEMAN, J.B. Transcriptional starts for cytheadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Microbiology Letters**, v.229, p.73-81, 2003.
- OKADA, M. et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.251-259, 2005.
- OPRIESSNIG, T. et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**, v.41, p.624-640, 2004.
- POUR-EL, I.; ADAMS, C. & MINION, F.C. Construction of mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*. **Plasmid**, v.47, p.129-137, 2002.
- QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: ART.MED, 2005. p.193-199
- RASMUSSEN, B.A.; GLUZMAN, Y. & TALLY, F.P. Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant, TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylicyclines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p.1658-1660, 1994.
- RAZIN S.V. Functional architecture of chromosomal DNA domains. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v.6, p.247-269, 1996.
- RAZIN, S.; YOGEV, D. & NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1094-1156, 1998.
- REDDY, S.P.; RASMUSSEN, W.G. & BASEMAN, J.B. Isolation and characterization of transposon Tn4001-generated, cytheadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Immunological and Medical Microbiology**, v.15, p.199-211, 1996.
- RENAUDIN, J. et al. Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.2870-2877, 1995.

RIBEIRO, F.C. et al. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.709-714, 2004.

ROPPA, L. **Competition from South American Pork Production**. Disponível em: <<http://www.banffpork.ca/proc/2005pdf/PFri-RoppaL.pdf>>. Acesso em: 12 de maio de 2007

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B., et al. **Disease of swine**. 8th. Iowa: Iowa State University, 1999. p. 495-509

SAKAI, H. et al. Correlation between shine–dalgarno sequence conservation and codon usage of bacterial genes. **Journal of Molecular Evolution**, v.52, p.164–170, 2001.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbour, 2001. 3v

SANCHEZ-PESCADOR, R. et al. The nucleotide sequence of the tetracycline resistance determinant tetM from *Ureaplasma urealyticum*. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1216-1217, 1988.

SCHMIDT, J.A.; BROWNIN, G G.F. & MARKHAM, P.F. Mycoplasma hyopneumoniae p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.5790-5798, 2004.

SHIMOJI, Y. et al. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**, v.21, p.532-537, 2003.

SIMMONS, W.L.; DENISON, A.M. & DYBVIG, K. Resistance of *Mycoplasma pulmonis* to complement lysis is dependent on the number of Vsa tandem repeats: shield hypothesis. **Infection and Immunity**, v.72, p.6846-6851, 2004.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. 2 ed., Goiânia: Impressos especiais, 1999. p. 358-362

SOBESTIANSKY, J. et al. **Pneumonia enzoótica suína**. Goiânia: Art3, 2001 a. p. 43

SOBESTIANSKY, J. et al. **Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de SC, RS e PR**. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPSA, 2001 b. p.6.

SOUTHERN GENOME INVESTIGATION PROGRAM. Disponível em: <<http://www.genesul.lncc.br/>>. Acesso em 30/05/2007.

STADEN, R.; JUDGE, D.P. & JAMES, K. **Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach**. Totawa: Human Press Inc, 2003. p.550

TEACHMAN, A.M. et al. Gene transfer in *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.947-951, 2002.

THACKER, E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research Reviews**, v.5, p.317-320, 2004.

TRACHTENBERG, S. Mollicutes – Wall-less Bacteria with Internal Cytoskeletons. **Journal of Structural Biology**, v.124, p. 244-256, 1998.

VASCONCELOS, A.T. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5568-5577, 2005.

VICCA, J. et al. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4470-4472, 2004.

WALDO, R.H., III et al. Transcriptional analysis of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.4978-4985, 1999.

WALKER, R.L. Mollicutes. In: HIRSH, D.C.; CHUNG, Y. **Microbiologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 155-162

WANG, H.; NOORDEWIJER M. & BENHAM, C.J. Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the *E. coli* genome: SIDD sites are closely associated with promoters. **Genome Research**, v.14, p.1575-1584, 2004.

WANG, H.; KALOPER, M. & BENHAM, C.J. SIDDDBASE: a database containing the stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) profiles of complete microbial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.D373-D378, 2006.

WEINER III, J.; HERRMANN R. & BROWNING, G.F. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.28, p.4488-4496, 2000.

WEINER III, J. et al. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.6306-6320, 2003.

WERNERSSON, R. Virtual Ribosome--a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.W385-W388, 2006.

YE, F. et al. Cloning and sequencing of the replication origin (*oriC*) of the *Spiroplasma citri* chromosome and construction of autonomously replicating artificial plasmids. **Current Microbiology**, v.29, p.23-29, 1994.

YOUNG, T.F. et al. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.269-279, 2000.

ZANELLA, J.R.C. Etiologia da Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) e papel do circovírus suíno tipo 2(PCV2). In: I Simpósio UFRGS sobre produção, reprodução e sanidade suína. **Anais**. Porto Alegre, RS, p.23-26, 2006.

ZHANG, J. & MADDEN, T.L. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. **Genome Research**, v.7, p. 649-656, 1997.

ZIELINSKI, G.C. & ROSS, R.F. Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1119-1124, 1992.

APÊNDICE A – Materiais e Métodos

BACTÉRIAS E PLASMÍDIOS.

TABELA 1 – Bactérias e plasmídios.

Estirpes/Plasmídios	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
<i>E.coli</i> cepa XL1-Blue	(<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^qZ.M15</i> Tn10 (Tet ^r)])	Stratagene™
<i>M. hyopneumoniae</i> linhagem 7448		Embrapa Suínos e Aves
pSRT1	<i>tetM</i> , <i>espir^{prom}</i>	LARTIGUE et al., 2002
pAM120	Tn916 (Tet ^R)	GAWRON-BURKE et al., 1984
pUC18	Ap, ColE1 replicon, MCS <i>lacZα</i> ⁺	YANISCH-PERRON et al., 1985
pOSTM	<i>tetM</i> , <i>oriC M. hyopneumoniae</i> , <i>espir^{prom}</i>	Este trabalho

espir^{prom}: região promotora do gene da espiralina.

Amostra de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Foi utilizada a linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* procedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), isolada de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil. Quando inoculada em suínos SPF (*specific pathogen free* – livre de patógenos específicos) causou doença e sempre produziu os sintomas característicos de PE.

Condições de Cultivo.

Quando retiradas dos estoques, as amostras foram cultivadas em meio Friis líquido, a 37°C sob leve agitação.

Extração do DNA genômico de *M. hyopneumoniae*.

O sedimento de células de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448 foi ressuspendido em 1 mL de tampão TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0) e homogeneizadas em vórtex. A suspensão foi dividida em dois tubos e foi adicionado em cada tubo 15 µL SDS 10% e 1,5µL proteinase K (20mg/mL) permanecendo em banho de água a 37°C durante uma hora. Em seguida, foram adicionados 100 µL NaCl 5M e 80 µL de CTAB 1% seguido de incubação a 65 °C durante 10 minutos. O extrato resultante foi submetido à purificação por volumes iguais de fenol:clorofórmio, seguido da precipitação por 600µL de isopropanol gelado e incubação a -20°C por aproximadamente 16 horas. O DNA resultante foi recuperado após centrifugação a 13000 rpm (14196 x g) durante 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento lavado duas vezes com etanol 70%. O DNA foi ressuspendido em água ultrapura estéril e armazenado 4°C durante 3 horas. Foram adicionados 3 µL de RNase (10mg/mL) seguido de incubação a 37°C durante uma hora. O DNA obtido foi estocado a uma temperatura de -20°C. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

Escherichia coli XL1-Blue.

Condições de Cultivo.

Foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido LB, a 37°C.

Purificação de DNA plasmidial.

O isolamento de plasmídios de *E.coli* em pequena escala baseou-se no método de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A bactéria *E.coli* contendo o plasmídio de interesse foi crescida em 3 mL de meio LB adicionado de antibióticos adequados. A cultura foi transferida para tubos plásticos de 1,5 mL e as células foram coletadas por centrifugação (14000 rpm (16464 x g), 1 minuto) e ressuspensas em 100 µL de solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0). A lise celular foi obtida com a adição de 200 µL de solução II (0,2 N NaOH, 1% SDS). As proteínas, o DNA cromossômico, os restos celulares e o SDS foram precipitados com a adição de 150 µL de solução III (acetato de potássio 5 M) e incubação durante 5 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm (16464 x g) por 5 minutos) e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O DNA plasmidial foi precipitado dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em estufa a 37 °C e dissolvido em 50 µL de água ultrapura estéril. Foi adicionado 1,5 µL de RNase (20 mg/mL) seguido de incubação a 37 °C durante uma hora. O DNA obtido foi estocado a uma temperatura de - 20 °C. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

OLIGONUCLEOTÍDEOS.

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados para construção do vetor de replicação em *M. hyopneumoniae* estão relacionados na Tabela abaixo.

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados

Oligonucleotídeos	Sequência
SPiR/PstI-UP	5' <u>CTG CAG</u> CAG AAT TAA AAG TTA GTG 3'
SPiR/SalI-DO	5' <u>GTC GAC</u> TTC ATT TCT TAT ATT TCC 3'
TETM/SalI-UP	5' <u>GTC GAC</u> ATG AAA ATT ATT AAT ATT GGA GTT T 3'
TETM/Bam-DO	5' <u>GGA TCC</u> CTA AGT TAT TTT ATT GAA CAT ATA 3'
MH_ORI-UP	5' TTT TTC TCC TTT TTT TGC TTA AAT TTA AGT 3'
MH_ORI-DO	5' TTT AGT TTT AAT AAT AAA AAT AAT AAG GCT 3'

CONDIÇÕES DE DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

As condições utilizadas para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante.

Uma a duas unidades das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para a digestão de 1 µg de DNA em um volume de 20 µL durante 3 horas na presença do tampão recomendado e a temperatura adequada para a enzima.

PREPARO DOS VETORES.

O vetor foi submetido à clivagem com enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, as enzimas foram desnaturadas por calor, conforme instruções do fabricante. A desfosforilação das extremidades do vetor linearizado foi obtida com a utilização de dez unidades de enzima SAP (*shrimp alkaline phosphatase* – fosfatase alcalina de camarão) por 2 horas a 37 °C.

LIGAÇÃO DE DNA.

Ligação de pUC18 com o fragmento da origem de replicação de *M. hyopneumoniae*.

A clonagem da origem de replicação amplificado do DNA genômico de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448 com primers específicos foi realizada de acordo com o protocolo de clonagem *blunt* de produto de PCR (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Numa única reação foram adicionados o vetor pUC18 íntegro e o inserto numa razão molar de 1:3, tampão *one for all* 10X (Invitrogen), 0,1 µL de 2-mercaptoetanol 100mM, 0,2 µL BSA (10 µg/µL), 1 µL ATP 10 mM, 2 µL dNTP 1mM, 0,2 µL SmaI (10 u/µL), 0,2 µL T4 DNA polimerase (5u/µL), 0,6 µL T4 DNA ligase (5u/µL) e q.s.p 20 µL de água ultra pura. As condições da reação foram 22 °C durante 4 horas. Neste método a ligação do inserto no plasmídeo elimina o sítio de restrição da enzima, impedindo que a enzima destrua os plasmídios recombinantes gerados durante a reação de ligação.

Ligação de pUC18 com a região promotora de espiralina.

A clonagem do promotor da espiralina obtido através da amplificação com primers específicos utilizando como DNA molde o plasmídeo pSRT1 também foi realizada de acordo com o protocolo de clonagem *blunt* de produto de PCR (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Numa única reação foram adicionados o vetor pUC18 íntegro e o inserto numa razão molar de 1:3.

Ligação de pUC18 com região de tetM.

O vetor linearizado e desfosforilado foi ligado ao inserto numa razão molar de 1:3. A estes foi adicionado tampão de ligação e 2,5 U de T4 DNA ligase (Fermentas) e a mistura foi incubada a 16 °C durante aproximadamente 16 horas (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

Ligação de DNA com extremidades coesivas.

O vetor linearizado e desfosforilado foi ligado ao inserto numa razão molar de 1:1. O inserto foi aquecido a 45 °C durante 5 minutos e resfriado em gelo antes da adição do tampão de ligação e de 2,5 U de T4 DNA Ligase (Fermentas). O sistema foi incubado a 16 °C durante aproximadamente 16 horas (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Preparo de células *E.coli* eletrocompetentes.

Foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001).

Preparo de células eletrocompetentes de *M. hyopneumoniae* (linhagem 7448).

Seis mililitros de uma cultura de *M. hyopneumoniae* foram inoculados em 54 mL de meio Friis. A cultura foi mantida a 37 °C até a mudança na cor do meio, determinada pelo indicador de pH vermelho-fenol. As células foram coletadas por centrifugação a 3360 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente e lavadas uma vez com tampão de eletroporação Hepes-sacarose (8mM Hepes, 272mM sacarose, pH 7,4) a 4 °C. Em seguida, foram centrifugadas novamente a 3360 x g por 30 minutos e ressuspensas em um volume final de 300 µL de tampão de eletroporação, a 4 °C.

Transformação bacteriana de *E. coli*.

Um volume de 1 ou 15 µL da solução de DNA a ser eletroporado foi adicionado a 40 µL de células eletrocompetentes (2×10^{10} a 3×10^{10} células/mL). A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm de espessura) e submetida a um campo elétrico (25 µFD; 2,5kV; 200 ohms) para induzir a entrada do DNA na bactéria.

Após a descarga elétrica, as células de *E. coli* foram transferidas para 1 mL do meio SOC ou LB e mantidas em recuperação a 37°C por uma hora. A suspensão de bactérias foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e IPTG (Isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo) nas concentrações indicadas por Sambrook & Russell (2001).

Seleção dos plasmídios recombinantes.

A seleção de plasmídios recombinantes construídos nos vetores pUC18 foi realizada pela inativação da expressão da enzima β-galactosidase, a qual é codificada pelo gene *lacZ*. O sítio de policlonagem destes vetores encontra-se inserido dentro do gene *lacZ'*, havendo inativação da β-galactosidase devido a entrada do inserto no vetor. As colônias que produzem a enzima β-galactosidase podem ser identificadas daquelas que não a produzem quando plaqueadas em meio LB sólido contendo o substrato incolor X-gal e IPTG. IPTG é um análogo da lactose e inativa o repressor do gene *lacZ* induzindo a transcrição do operon *lac*. A enzima β-galactosidase é capaz de hidrolisar o X-gal formando um produto de coloração azul. Assim as colônias que produzem esta enzima ficam azuis, enquanto aquelas que não a possuem permanecem brancas. Após seleção, as colônias brancas foram cultivadas em meio LB contendo ampicilina. A análise dos plasmídios recombinantes foi feita por digestão com as enzimas de restrição adequadas.

Transformação bacteriana de *M. hyopneumoniae*.

Dez microgramas do plasmídio a ser eletroporado foram adicionados em 100 µL de células eletrocompetentes. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm de espessura) e submetida a um campo elétrico (25 µFD; 2,5kV; 400 Ω; 4,8 a 5,5 milisegundos) para induzir a entrada do DNA na bactéria.

Após a descarga elétrica, as células de *M. hyopneumoniae* foram transferidas para 900 µL de meio Friis líquido e incubadas a 37 °C durante 3 horas para recuperação das células.

Seleção das células de *M. hyopneumoniae* transformantes.

Metade do volume de suspensão de bactérias foi cultivada em meio Friis sólido contendo tetraciclina (2 µg/mL). Em cada placa foram inoculados 100 µL da suspensão da bactéria e espalhados com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a

37 °C, em microaerofilia, por 10 dias. Ao volume restante foi adicionado igual volume de meio Friis líquido, tetraciclina para a concentração final de 2 µg/mL e incubado a 37 °C até a visualização da mudança de cor do meio.

Para controle da sobrevivência das células após a descarga elétrica, 100 µL de células eletrocompetentes foram eletroporadas sem a presença do DNA. Após a descarga elétrica, as células de *M. hyopneumoniae* foram transferidas para 900 µL de meio Friis e mantidas em recuperação a 37°C durante 3 horas. A diluição de 1:10 da suspensão de bactérias foi cultivada em meio Friis sólido.

Para o controle da viabilidade das células após as lavagens com o tampão de eletroporação as células de *M. hyopneumoniae* foram transferidas para 900 µL de meio Friis e mantidas em recuperação a 37°C durante 3 horas. A diluição de 1:10 da suspensão de bactérias foi cultivada em meio Friis sólido.

A susceptibilidade de *M. hyopneumoniae* ao antimicrobiano tetraciclina foi confirmada pela inoculação de células eletroporadas sem a presença de DNA e células não eletroporadas em meio Friis sólido contendo tetraciclina (2 µg/mL).

Em cada placa foram inoculados 100 µL da suspensão e espalhados com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37 °C, em microaerofilia, por 10 dias e visualizadas com auxílio de lupa.

SEQÜENCIAMENTO DE DNA.

Reação de seqüenciamento.

Para cada reação de seqüenciamento foi utilizado o *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amershan Pharmacia Biotech). De acordo com o protocolo do fabricante do kit foi adicionado 100 a 200 fmoles de DNA molde, 5 pmol de oligonucleotídeo, premix de reagentes para seqüenciamento e água para completar o volume final de 20µl de cada reação. O premix de reagentes contém quatro didesoxinucleotídeos (ddG, ddA, ddT e ddC) cada um marcado com fluoresceína e um dos quatro diferentes corantes Rhodamine (Rhodamine 110, Rhodamine-6-G, Tetrametil Rhodamine e Rhodamine X), e DNA polimerase *Thermo Sequenase™ II* (Amershan Pharmacia Biotech).

As condições de reação usadas foram: 95 °C por 20 segundos; 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos, durante 30 ciclos.

Após o término da reação foi adicionado 2 µL do tampão acetato de amônio 7,5 M em cada tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 55 µl de etanol absoluto. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Os sedimentos de DNA foram lavados com etanol 70 % e os tubos centrifugados novamente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento seco.

Ressuspensão das amostras e eletroforese.

Os sedimentos foram ressuspensos em solução de carregamento do *Kit ET-terminator* (Amershan Pharmacia Biotech) e injetadas no aparelho seqüenciador *MegaBACE™* (Amershan Pharmacia Biotech) de acordo com o protocolo do fabricante do equipamento.

Análise das seqüências.

As seqüências nucleotídicas obtidas por seqüenciamento foram analisadas no *software* Phred e no pacote *Staden* (STADEN et al., 2003), e comparadas com o banco de dados GenBank utilizando a ferramenta BlastN (ZHANG & MADEN, 1997).

CONSTRUÇÃO DO VETOR pOSTM.

A amplificação da seqüência nucleotídica correspondente à origem de replicação do *M. hyopneumoniae* foi realizada a partir do DNA cromossomal de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448 com os oligonucleotídeos específicos MH_ORI-UP e MH_ORI-DO. O produto da amplificação compreende um fragmento de 1700 pb que possui o gene *dnaA* e regiões adjacentes. Este fragmento foi clonado no vetor pUC18 digerido com a enzima SmaI gerando o vetor pOM.

A amplificação da região promotora do gene que codifica para espiralina de *Spiroplasma faecalis* foi realizada a partir do plasmídio pSRT1 com os iniciadores específicos SPIR/PstI-UP e SPIR/SalI-DO. A amplificação gerou sítios de restrição das enzimas PstI e SalI nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O fragmento de 342 pb foi clonado no vetor pUC18 digerido com a enzima SmaI gerando o plasmídio pSP. Este plasmídio foi clivado com as enzimas de restrição PstI e SalI. O fragmento isolado foi subclonado no vetor pOM, nos sítios PstI e SalI, originando o plasmídio pOSM.

O gene de resistência à tetraciclina foi amplificado a partir do plasmídio pAM120 com os iniciadores TETM/SalI-UP e TETM/Bam-DO gerando um produto de amplificação com sítio de SalI na extremidade 5' e BamHI na extremidade 3', o qual foi ligado no sítio SmaI do vetor pUC18 (pTE). Um fragmento SalI/BamHI de 1917 pb correspondente a seqüência nucleotídica do gene *tetM* foi subclonado no plasmídio pOM2, digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídio replicativo pOSTM.

O plasmídio replicativo construído (pOSTM), o qual possui um cassete de DNA que confere resistência à tetraciclina e origem de replicação de *M. hyopneumoniae*, foi utilizado para transformar *M. hyopneumoniae* linhagem 7448.

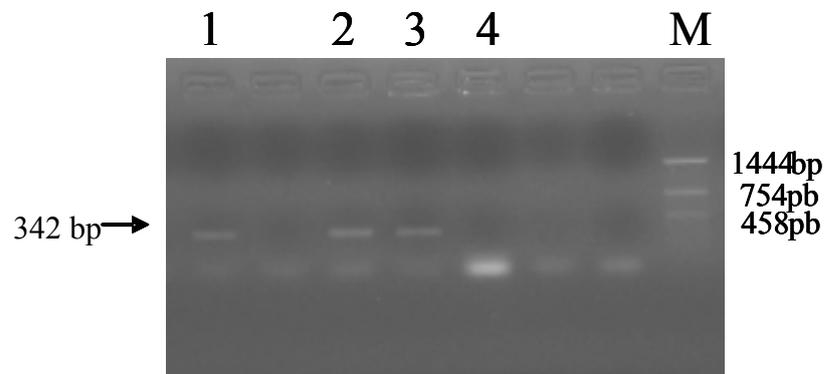
APÊNDICE B – Eletroforese de produtos de PCR

Figura 1 – Eletroforese de produtos de PCR obtidos por amplificação com iniciadores SPIR/PstI-UP e SPIR/SalI-DO para detecção da presença de pOSMT em clones de *M. hyopneumoniae* resistentes à tetraciclina (linhas 1, 2 e 3). Linha 4 - Controle negativo; M - Marcador molecular. Gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

APÊNDICE C – Sequências nucleotídica e de aminoácidos do gene *tetM*

VIRTUAL RIBOSOME

Translation table: Mold Mitochondrial; Protozoan Mitochondrial; Coelenterate SGC3

>pOSTM_errado (411bp - 2678bp, direct) 2268bp_rframe3_ORF

Reading frame: 3

```

5' CTGCAGCAGAATTAAGTTAGTGAACAAGAAAACAGTGAAGCACCAGTTTCTGAACCAAAGACGAAAAACAAAAAAGATTAAG 90
5' CAATTTATTTGGAAAATCTTTTTTGT'TTTTTTAAAGAAATATTTATTGT'TTTTTTAAAAAATATGTACAATTGCTACTATAAGGGAAA 180

5' GAAAAAAGAAAGATATAAATTGTATAAAGTAGGGTTAGAAGCAATTAATAATTATTATTAATGTTATTTTCTCTTATATATTCAAATGT 270
                                     -35
5' AATTTTAATTACATTTGCTTTTAATAAAAACTACTTAAATAGAGAAAGGAATATAAGAAATGAAGTCGACTGAAAATTTAATATTG 360
-10      M H L L L I K T L L N R E R K Y K K W S R L K I I N I
5' AATTTTAATTACATTTGCTTTTAATAAAAACTACTTAAATAGAGAAAGGAATATAAGAAATGAAGTCGACTGAAAATTTAATATTG 360
                                     ATG

G V L A H V D A G K T T L T E S L L Y N S G A I T E L G S V
5' GAGTTTGTAGCTCATGTTGATGCAGGAAAACTACCTTAACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGG 450
D K G T T R T D N T L L E R Q R G I T I Q T G I T S F Q W E
5' ACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTGACAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAA 540
N T K V N I I D T P G H M D F L A E V Y R S L S V L D G A I
5' ATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCAGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTCATTATCAGTTTGTAGATGGGGCAATTC 630
L L I S A K D G V Q A Q T R I L F H A L R K M G I P T I F F
5' TACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAAGCACAAACTCGTATATTATTTTCATGCACTTAGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTTA 720
I N K I D Q N G I D L S T V Y Q D I K E K L S A E I V I K Q
5' TCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAAGAGAAACCTTCTGCCGAAATTGTAATCAAACAGA 810
K V E L Y P N V C V T N F T E S E Q W D T V I E G N D D L L
5' AGGTAGAAGTGTATCCTAATGTGTGTGTGACGAACTTTACCGAATCTGAACAATGGGATACGGTAATAGAGGGAAACGATGACCTTTTAG 900
E K Y M S G K S L E A L E L E Q E E S I R F Q N C S L F P L
5' AGAAATATATGTCGGTAAATCATTAGAACGATTGGAAGTGAACAAGAGGAAAGCATAAGATTTCAGAATTGTCTCTGTTCCCTCTTT 990
Y H G S A K S N I G I D N L I E V I T N K F Y S S T H R G P
5' ATCATGGAAGTGCAAAAAGTAATATAGGGATTGATAACCTTATAGAAGTTATTACTAATAAAATTTTATTCATCAACACATCGAGGTCCGT 1080
S E L C G N V F K I E Y T K K R Q R L A Y I R L Y S G V L H
5' CTGAACCTTTCGCGAAATGTTTCAAAATGAATATACAAAAAAGACAACGCTTTCATATATACGCCTTTATAGTGGAGTACTACATT 1170
L R D S V R V S E K E K I K V T E M Y T S I N G E L C K I D
5' TACGAGATTCGGTTAGAGTATCAGAAAAAGAAAAAATAAAAGTTACAGAAATGTATACTTCAATAAAATGGTGAATTATGTAAGATTGATA 1260
R A Y S G E I V I L Q N E F L K L N S V L G D T K L L P Q R
5' GAGCTTATTTCTGGAGAAATGTTATTTTGCAAAATGAGTTTTTGAAGTTAAATAGTGTCTTGGAGATACAAAACATTGCCACAGAGAA 1350
K K I E N P H P L L Q T T V E P S K P E Q R E M L L D A L L
5' AAAAGATTGAAAATCCGCACCCTCTACTACAAACAACGTTGAACCGAGTAAACCTGAACAGAGAGAAATGTTGCTTGATGCCCTTTTGG 1440
E I S D S D P L L R Y Y V D S T T H E I I L S F L G K V Q M
5' AAATCTCAGATAGTATCCGCTTCTACGATATTACGTGGATTCTACGACACATGAAATTATACCTTTCTTTCTTAGGGAAAGTACAAATGG 1530
E V I S A L L Q E K Y H V E I E L K E P T V I Y M E R P L K
5' AAGTGATTAGTGCCTGTGCAAGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAACTAAAAGAGCCTACAGTCATTTATATGGAGAGACCGTTAAAAA 1620
N A E Y T I H I E V P P N P F W A S I G L S V S P L P L G S
5' ATGCAGAAATATACCATTACATCGAAGTGCCGCCAAATCCTTTCTGGGCTTCCATTGGTTTATCTGTATCACCGCTTCCGTTGGGAAGTG 1710
G M Q Y E S S V S L G Y L N Q S F Q N A V M E G I R Y G C E
5' GAATGCAGTATGAGAGCTCGGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATCATTTCAAAATGCAGTTATGGAAGGGATACGCTATGGTTGTGAAC 1800
Q G L Y G W N V T D C K I C F K Y G L Y Y S P V S T P A D F
5' AAGGATGTATGGTTGGAATGTGACGGACTGTAAAATCTGTTTTAAGTATGGCTTATACTATAGCCCTGTAGTACCCAGCAGATTTTC 1890
R M L A P I V L E Q V L K K A G T E L L E P Y L S F K I Y A
5' GGATGCTTGCTCCTATTGTATTGGAACAAGTCTTAAAAAAGCTGGAACAGAATTGTTAGAGCCATATCTTAGTTTTAAATTTATGCGC 1980
P Q E Y L S R A Y N D A P K Y C A N I V D T Q L K N N E V I

```

5' CACAGGAATATCTTTCACGAGCATACAACGATGCTCCTAAATATTGTGCGAACATCGTAGACTCAATTGAAAAATAATGAGGTCATTC 2070
 L S G E I P A R C I Q E Y R S D L T F F T N G R S V C L T E
 5' TTAGTGGAGAAATCCCTGCTCGGTGTATTCAAGAATATCGTAGTGATTAACTTCTTTACAAATGGACGTAGTGTGTTTAAACAGAGT 2160
 L K G Y H V T T G E P V C Q P R R P N S R I D K V R Y M F N
 5' TAAAAGGGTACCATGTTACTACCGGTGAACCTGTTTGCCAGCCCCGTCGTCCAAATAGTCGGATAGATAAAGTACGATATATGTTCAATA 2250
 K I T
 5' AAATAACTTAGGGATCCC 2268

LEGENDA:

Negrito e sublinhado : Códon de iniciação alternativos
 Caixa preta : Regiões -35 e -10
 Caixa : Sequência RBS
 ATG : Códon de iniciação da tradução de tetM