

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise de domínios diferenciais em proteínas de superfície ortólogas de  
*Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare***

Dissertação de Mestrado

Fernanda Munhoz dos Anjos Leal

Porto Alegre, março de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise de domínios diferenciais em proteínas de superfície ortólogas de  
*Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare***

Fernanda Munhoz dos Anjos Leal

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Coorientador: Dra. Veridiana Gomes Virginio

Porto Alegre, março de 2015

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Aos meus pais.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela dedicação na orientação e confiança em mim deposita na realização deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Veridiana G. Virgínio, pela orientação e ajuda na realização dos experimentos e pela amizade.

Aos professores Dr. Arnaldo Zaha e Dra. Irene S. Schrank, pela participação na comissão de acompanhamento e pelas sugestões ao longo deste trabalho.

À professora Dra. Cristina Bonorino, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo auxílio nos experimentos.

À aluna de IC, Carolina L. Martello, pelo apoio nos experimentos, pela amizade e cupcakes.

Aos colegas do lab. 210, Jéssica, Karina, Gabi, Alemão e Lauren por compartilharem todos os momentos ao longo deste trabalho, pelas sugestões e amizade.

Aos colegas dos labs. 206 e 204, Tati, Edi, Aline, Bruna, João, Sérgio, Guilherme S., Guilherme B., Jefferson, Fernanda Z., Filipe e Helier pelas conversas, ajuda e amizade.

Aos funcionários do Cbiot, especialmente a Sílvia e o Luciano, por toda ajuda.

À minha família, em especial minha mãe Cynthia, pelo amor e apoio incondicional recebido e pelo incentivo para alcançar meus objetivos.

Ao meu namorado, Cristiano M. Zimmer, pelo amor, companheirismo e dedicação em me aconselhar e incentivar sempre.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus.

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Classe Mollicutes.....	14
1.2. Gênero <i>Mycoplasma</i> .....	15
1.3. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	16
1.4. <i>Mycoplasma flocculare</i> .....	19
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....	20
2.1. Justificativas .....	20
2.2. Objetivo geral.....	21
2.3. Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Análise <i>in silico</i> de proteínas de superfície ortólogas.....	22
3.2. Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	22
3.3. Extração de DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. flocculare</i> .....	23
3.4. Amplificação de sequências-alvo e clonagem em vetor de expressão.....	23
3.5. Expressão e purificação de polipeptídeos recombinantes .....	24
3.6. Imunização de camundongos .....	25
3.7. Análise da resposta imune humoral.....	25
3.8. Análise da resposta imune celular .....	26
4. RESULTADOS .....	26
4.1. Análise <i>in silico</i> de domínios diferenciais em proteínas de superfície ortólogas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 e <i>M. flocculare</i> .....	26
4.2. Expressão dos domínios diferenciais ortólogos de MHP612 e MF357 .....	29
4.3. Avaliação da resposta imune em camundongos induzida pelos polipeptídeos rMHP612 <sub>67-169</sub> e rMF357 <sub>67-197</sub> .....	30
5. DISCUSSÃO .....	34

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
ANEXO .....	49
CURRICULUM VITAE RESUMIDO.....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CDS** – sequência(s) de DNA codificadora(s)

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**DP** – desvio padrão

**ELISA** – ensaio imunoenzimático indireto

**GST** – glutationa-S-transferase

**IFN- $\gamma$**  – interferon- $\gamma$

**IgA** – imunoglobulina A

**IgG** – imunoglobulina G

**IL-10** – interleucina-10

**IL-1 $\beta$**  – interleucina-1 $\beta$

**IL-4** – interleucina-4

**IL-6** – interleucina-6

**IL-8** – interleucina-8

**IPTG** – isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**kb** – quilobase(s)

**kDa** – quilodaltons(s)

**LPS** – lipopolissacarídeo(s)

**NCBI** – Centro Nacional de Informação para Biotecnologia

**nt** – nucleotídeo(s)

**OD** – densidade óptica

**OPD** – o-fenileno-diamina

**pb** – par(es) de base(s)

**PBS** – solução salina tamponada com fosfato

**PCR** – reação em cadeia da polimerase



**PES** – pneumonia enzoótica suína

**SDS** – dodecilsulfato de sódio

**SDS-PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

**Ta** – temperatura de anelamento

**Th1** – linfócito T auxiliar do tipo 1

**Th17** – linfócito T auxiliar do tipo 17

**Th2** – linfócito T auxiliar do tipo 2

**TLR2** – receptor do tipo Toll 2

**TNF- $\alpha$**  – fator de necrose tumoral- $\alpha$

**TRL6** – receptor do tipo Toll 6

**VNTR** – número variável de repetições em tandem

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eletromicrografia do cultivo de epitélio ciliar suíno com <i>M. hyopneumoniae</i> linhagem 91-3 .....	19
Figura 2: Eletromicrografia do cultivo de epitélio ciliar suíno com <i>M. flocculare</i> isolado 7160T.....	20
Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas de superfície ortólogas de <i>M. hyopneumoniae</i> (MHP7448_0612) e <i>M. flocculare</i> (MF_00357) .....	28
Figura 4. Produtos de amplificação das sequências nucleotídicas dos domínios diferenciais da MHP7448_0612 e MF_00357 .....	29
Figura 5. Análise eletroforética dos polipeptídeos rMF357 <sub>67-197</sub> e rMHP612 <sub>67-169</sub> purificados .....	30
Figure 6. Padronização do título dos níveis de IgG específico no soro de camundongos imunizados com os polipeptídeos recombinantes rMHP612 <sub>67-169</sub> e rMF357 <sub>67-197</sub> e LPS determinados por ELISA indireto.....	32
Figure 7. Níveis de IgG específico no soro de camundongos imunizados com os polipeptídeos recombinantes rMHP612 <sub>67-169</sub> e rMF357 <sub>67-197</sub> determinados por ELISA indireto .....	33
Figura 8. Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com os polipeptídeos rMHP612 <sub>67-169</sub> e rMF357 <sub>67-197</sub> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação das sequências nucleotídicas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 e <i>M. flocculare</i> .....	24
--	----

## RESUMO

*Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare* são duas espécies geneticamente muito similares. *M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, enquanto *M. flocculare* é amplamente distribuído em rebanhos suínos, mas nenhuma doença decorrente da sua presença é observada. O repertório de proteínas ortólogas compartilhadas entre estas duas espécies é de 70% e de proteínas de superfície chega em torno de 90%. Diferenças estruturais e funcionais entre as proteínas ortólogas poderiam explicar, pelo menos em parte, o caráter de patogenicidade ou não destas espécies. A fim de identificar domínios diferenciais, foi realizada uma análise comparativa *in silico* das proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Foram analisados 184 pares de proteínas ortólogas e foram identificados domínios diferenciais em 85% deles. As sequências codificadoras das regiões diferenciais do par de proteínas hipotéticas ortólogas MHP7448\_0612, de *M. hyopneumoniae*, e MF\_00357, de *M. flocculare*, foram clonadas em vetor de expressão pGEX-4T-3 e expressas em *Escherichia coli* para a produção dos polipeptídeos recombinantes correspondentes (rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>, respectivamente). A resposta imune humoral e celular de camundongos foi analisada para avaliação das possíveis propriedades imunológicas diferenciais de domínios correspondentes de *M. hyopneumoniae* e de *M. flocculare*. Ambos os polipeptídeos recombinantes induziram altos níveis de IgG a partir do dia 30 pós-imunização em relação ao grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os níveis de IgG entre os animais imunizados com os polipeptídeos recombinantes. Na avaliação da resposta celular, rMHP612<sub>67-169</sub> induziu níveis significativamente maiores de IFN- $\gamma$  e IL-10 em esplenócitos de camundongos não imunizados em relação aos níveis induzidos por rMF357<sub>67-197</sub> ou aos observados no controle sem estímulo. Os domínios diferenciais induziram respostas imunes celulares diferenciais em camundongos. Esses resultados apontam um possível envolvimento de domínios diferenciais na resposta imune do hospedeiro contra *M. hyopneumoniae* e no desenvolvimento da doença.

## ABSTRACT

*M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* are two genetically similar bacterial species. *M. hyopneumoniae* is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia, while *M. flocculare* is also widespread in swine herds, although no disease has been associated with its presence. The repertoire of orthologous proteins between *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* are 70% of total CDS and 90% of surface proteins. Functional and structural differences between orthologous surface proteins could explain the pathogenicity or non-pathogenicity of these species. To identify differential domains between pairs of orthologous, a comparative *in silico* analysis of orthologous surface proteins between these two species was performed. A total of 184 ortholog pairs were analyzed and differential domains were found in 85% of them. The coding sequences of differential domains from the pair of ortholog hypothetical proteins MHP7448\_0612, from *M. hyopneumoniae*, and MF\_00357, from *M. flocculare*, were cloned into pGEX-4T-3 and expressed in *E. coli* for the production of the correspondent recombinant polypeptides (rMHP612<sub>67-169</sub> and rMF357<sub>67-197</sub>, respectively). The humoral and cellular immune response from mice were assessed to evaluate the possible differential immunological properties of corresponding domains from *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*. Both recombinant polypeptides induced high levels of IgG starting at 30 post-immunization in comparison to the control group, but no significant difference was observed between IgG levels from mice immunized with the recombinant polypeptides. Regarding cellular immune responses, rMHP612<sub>67-169</sub> induced high levels of IFN- $\gamma$  e IL-10 in splenocytes from non-immunized mice, in comparison to the levels observed in animals immunized with rMF357<sub>67-197</sub> or in the non-stimulated control group. Differential domains induced differential cellular immune response in mice. This results suggest a possible involvement of differential domains in host immune response against *M. hyopneumoniae* and in disease development.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Classe Mollicutes

As espécies da classe Mollicutes estão posicionadas em um ramo único da árvore filogenética de bactérias, tendo evoluído a partir de um ancestral comum da classe Firmicutes, com baixo teor G+C, cerca de 605 milhões de anos atrás (Sirand-Pugnet et al., 2007). Os mollicutes são divididos em dois ramos: ramo AAA, contendo os gêneros *Asteroleplasma*, *Anaeroplasma*, *Acholeplasma* e o filo *Phytoplasma*; e o ramo SEM, abrangendo os gêneros *Spiroplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (Razin et al., 1998). Organismos pertencentes ao ramo SEM infectam o homem e uma variedade de animais, enquanto o ramo AAA reúne fitoplasmas patogênicos para plantas (Sirand-Pugnet et al., 2007).

A evolução dos mollicutes foi marcada por reduções genômicas, resultando em genomas pequenos com tamanhos variando entre 580 kb, para *Mycoplasma genitalium*, e 1358 kb, para *Mycoplasma penetrans* HF-2, no gênero *Mycoplasma* (Bové, 1993; Liu et al., 2012; Rottem & Barile, 1993). Os genomas das espécies desta classe apresentam baixo teor G+C, que varia entre 24 a 33 mol% (Razin et al., 1998). No código genético das espécies pertencentes ao ramo SEM, o códon de parada UGA é codificado como códon de triptofano (Iriarte et al., 2011). A consequência desta modificação levou à deleção do gene codificador do fator de liberação 2 (RF2) mantendo apenas o gene codificador do fator de liberação 1 (RF1), que reconhece os códons UAG e UAA (Razin et al., 1998).

A perda da parede celular, outra característica dos mollicutes, confere propriedades como a sensibilidade ao choque osmótico e a detergentes, e determina a formação de colônias com morfologia peculiar. Além disso, as células apresentam uma forma predominantemente esférica, embora muitas espécies possam apresentar colônias com diferentes morfologias (Razin & Hayflick, 2010). Também devido à ausência da parede celular, as interações entre mollicutes e o sistema imunológico de seus hospedeiros se dá em grande parte através da sua

membrana plasmática (Chambaud et al., 1999) e todos os mollicutes são resistentes a inibidores da síntese de parede celular, como beta-lactâmicos, glicopeptídeos, fosfomicinas, polimixinas, sulfonamidas, trimetoprina, ácido nalidíxico e rifampicina (Bébéar et al., 2011).

A limitada capacidade de biossíntese, como a ausência do ciclo do ácido tricarboxílico ou de rotas da síntese de aminoácidos, torna os mollicutes dependentes do microambiente do hospedeiro para suprir um amplo espectro de precursores necessários para a biossíntese de macromoléculas (Rottem, 2003). A maioria dos mollicutes vive de forma comensal nos seus hospedeiros e, em artrópodes, podem ser considerados simbiossiontes (Razin et al., 1998). No caso das espécies patogênicas, as infecções raramente são do tipo aguda, mas seguem um curso crônico (Razin & Hayflick, 2010), com preferência para as superfícies de mucosa, como as dos trato respiratório e genital (Citti et al., 2010).

## **1.2. Gênero *Mycoplasma***

O gênero *Mycoplasma* compreende mais de 120 espécies encontradas em um amplo espectro de hospedeiros, incluindo seres humanos, animais e plantas (Razin et al., 1998). O genoma reduzido e o interesse econômico decorrente das doenças causadas por espécies deste gênero fizeram com que estas bactérias estivessem entre os primeiros organismos cujos genomas foram completamente sequenciados (Fraser et al., 1995). Atualmente, existem 43 genomas de diferentes espécies e linhagens do gênero *Mycoplasma* disponíveis em banco de dados públicos.

Em seres humanos, ao menos 16 espécies de micoplasmas já foram isoladas (Liu et al., 2012), sendo os mais estreitamente associados com doenças humanas *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma fermentans* (Nicholas et al., 2009). *M. pneumoniae* é o agente da pneumonia atípica em crianças e adolescentes. Além disso, o desenvolvimento de infecções crônicas e a persistência e severidade de sintomas asmáticos têm sido associados a essa espécie (Kim et al., 2014). *M. genitalium* tem sido relacionado com infecções do trato urogenital em homens e mulheres e é o agente etiológico da

uretrite não gonocócica em homens (Sethi et al., 2012). Doenças como cofator para a síndrome da imunodeficiência adquirida, a prevalência de artrite reumatoide, infecção do trato genital e síndrome da fadiga crônica têm sido associadas a *M. fermentans* (Liu et al., 2012; Shu et al., 2012).

Dependendo da espécie, micoplasmas podem colonizar o meio extracelular, onde se aderem externamente às células e tecidos do hospedeiro, ou possuírem a capacidade de penetrar e ocupar a região intracelular (Baseman et al., 1995). A adesão é o pré-requisito inicial para a colonização e infecção, e a perda da capacidade de aderência por mutações resulta em perda da infectividade (Razin & Hayflick, 2010). Mecanismos de regulação gênica e mutações aleatórias estão ausentes em micoplasmas devido a perdas genômicas, sendo substituídos pelo acoplamento de conjuntos particulares de genes com mudanças rápidas e reversíveis que produzem variantes de superfície celular em uma população isogênica (Citti et al., 2010).

Toxinas potentes não têm sido associadas com micoplasmas. Apenas produtos moderadamente tóxicos do metabolismo como peróxido de hidrogênio e radicais superóxido causando dano oxidativo nas membranas da célula do hospedeiro (Razin et al., 1998). O quadro clínico por infecções por micoplasmas em seres humanos e animais tem sido associado aos danos causados pela resposta imune e inflamatória do hospedeiro do que efeitos tóxicos dos componentes celulares (Razin & Hayflick, 2010).

### **1.3. *Mycoplasma hyopneumoniae***

*M. hyopneumoniae* é um exemplo de micoplasma encontrado no trato respiratório de suínos (Stemke & Robertson, 1990) e o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES). A PES é uma enfermidade de curso crônico altamente prevalente (variando entre 38 a 100%) (Simionatto et al., 2013), e causa perdas econômicas significativas devido ao aumento no uso de antibióticos e a diminuição da *performance* dos suínos (Maes et al., 2008). Os sintomas principais da PES são caracterizados por lesões pulmonares, tosse não produtiva, leve febre e anorexia, principalmente em suínos na fase final de produção (Sibila et al.,



2009). A severidade dos sintomas depende da presença de infecções secundárias e condições ambientais.

A avaliação das lesões pulmonares em uma amostra de suínos no momento do abate tem sido utilizada para estimar a incidência de PES dentro de um rebanho suíno e no preço de mercado da carcaça (Sibila et al., 2009). O isolamento de *M. hyopneumoniae* dos pulmões de suínos por cultivo bacteriológico é considerado a técnica padrão-ouro para o diagnóstico (Thacker 2004). A necessidade de um meio especializado (Sibila et al., 2009), o lento crescimento do organismo e a contaminação por outros micoplasmas, como *M. flocculare* e *Mycoplasma hyorhinis* (Maes et al., 1996) impede a utilização da técnica rotineiramente. Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* são os mais comumente usados, sendo um comercial de bloqueio (IDEI, Mycoplasma hyopneumoniae EIA kit, Oxoid) e dois testes de ELISA indiretos, um comercial (HerdCheck, IDEXX) e o produzido em laboratório Tween 20-ELISA (Sibila et al., 2009). No entanto, estes testes ainda apresentam uma baixa sensibilidade, dificuldade em diferenciar animais vacinados de infectados, presença de imunidade adquirida maternamente e reatividade cruzada com *M. flocculare* e *Mycoplasma hyosynoviae* (Neto et al., 2014).

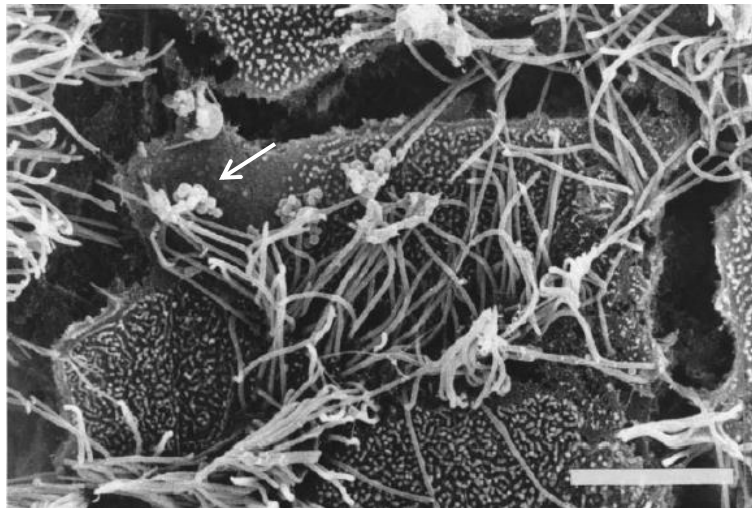
Vacinas comerciais para a PES, baseadas em preparações de bacterinas inativadas, são amplamente aplicadas em rebanhos suínos. O uso destas vacinas aumenta o ganho de peso diário e a taxa de conversão alimentar e reduz os sinais clínicos e as lesões pulmonares (Maes et al., 2008), porém não impede a transmissão de *M. hyopneumoniae* entre os animais (Meyns et al., 2006). Devido aos problemas enfrentados com vacinas baseadas em bacterinas de *M. hyopneumoniae*, estudos com antígenos recombinantes têm demonstrado potencial (Conceição et al., 2006; Galli et al., 2012; Simionatto et al., 2013; Virginio et al., 2014), mas estas formulações ainda não estão disponíveis comercialmente. Alternativas ao controle da infecção por *M. hyopneumoniae* incluem a otimização de práticas de manejo e condições de habitação, através de sistemas de produção *all-in/all-out*, densidade de animais, tamanho do rebanho, melhoria nas condições de habitação e medidas de biossegurança (Maes et al., 2008).

A adesão de *M. hyopneumoniae* ao epitélio ciliar da traqueia, brônquios e bronquíolos é o pré-requisito para o início da doença. Após a infecção, o micoplasma situa-se no ápice dos cílios, no espaço interciliar ou em contato com as microvilosidades (Maes et al., 1996). A permanência da infecção reduz a atividade ciliar, levando a uma perda completa dos cílios, presença de exsudatos nas vias aéreas e destruição das células epiteliais (DeBey & Ross, 1994).

A adesão de *M. hyopneumoniae* às células hospedeiras é um processo multifatorial que envolve várias adesinas já descritas, cuja expressão pode variar entre linhagens patogênicas e não patogênicas (Pinto et al., 2009) e o reconhecimento de receptores glicoconjugados na células do suíno (Zhang et al., 1994). A primeira e mais estudada adesina identificada foi a P97 (Zhang et al., 1995). A inibição da proteína P97 por anticorpos diminui a capacidade de aderência de *M. hyopneumoniae* às células hospedeiras (Zhang et al., 1995) e um mínimo de oito regiões repetitivas denominadas R1 são necessárias para a adesão (Minion et al., 2000). A capacidade de ligação aos cílios também foi demonstrada para as adesinas P216 (Wilton et al., 2009), P102 (Seymour et al., 2012), Mhp271 (Deutscher et al., 2010), Mhp107 (Seymour et al., 2011), Mhp683 (Bogema et al., 2011) e Mhp194 (Raymond et al., 2014). Outras moléculas do suíno, como receptores glicoconjugados (Zhang et al., 1994), heparina (Burnett et al., 2006; Deutscher et al., 2010; Jenkins et al., 2006; Raymond et al., 2013; Wilton et al., 2009), plasminogênio (Seymour et al., 2012; Woolley et al., 2013) e fibronectina (Deutscher et al., 2010; Raymond et al., 2014), também foram identificadas como alvos de ligação de proteínas de *M. hyopneumoniae*. No entanto, o mecanismo exato de aderência aos cílios ainda não está totalmente elucidado.

A resposta imune no pulmão do hospedeiro suíno é considerada determinante de patologia do *M. hyopneumoniae* (Damte et al., 2011). Após a adesão de *M. hyopneumoniae* às células suínas, no local da infecção ocorre uma inflamação aguda das vias respiratórias, que leva à hiperplasia epitelial e infiltração da lâmina própria por células inflamatórias, principalmente neutrófilos e células mononucleares (Livingston et al., 1972), acarretando danos ao tecido, com

perda ciliar (Park et al., 2002) (Figura 1). O aumento das citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8) e a interleucina -18 (IL-18) também ocorre em infecções por *M. hyopneumoniae* (Choi et al., 2006; Damte et al., 2011; Muneta et al., 2008; Woolley et al., 2012). Os receptores do tipo Toll 2 e 6 (TLR2 e TLR6) medeiam a indução de tais citocinas na resposta inflamatória (Muneta et al., 2003).

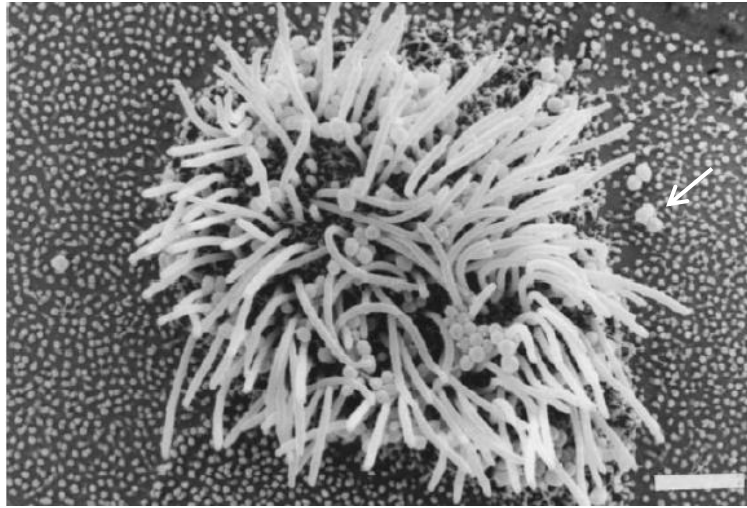


**Figura 1: Eletromicrografia do cultivo de epitélio ciliar suíno com *M. hyopneumoniae* 91-3.** Eletromicrografia mostrando a aderência e o dano no epitélio ciliar suíno causado pela linhagem patogênica 91-3 de *M. hyopneumoniae* (indicada por seta). Barra de escala = 5  $\mu$ m. Adaptada de Young et al. (2000).

#### **1.4. *Mycoplasma flocculare***

*M. flocculare* também é amplamente presente em rebanhos suínos em pulmões normais e com lesões (Kobisch & Friis, 1996). Este micoplasma também é capaz de aderir ao trato respiratório dos suínos, mas sem ocasionar dano ao epitélio ciliar, como o observado em infecções por *M. hyopneumoniae* (Figura 2).

Após a infecção experimental em suínos, já foi detectada a produção de anticorpos específicos contra *M. flocculare* (Bereiter et al., 1990). No entanto, até o momento, ainda não há estudos sobre o papel da resposta imunológica do hospedeiro contra esta bactéria.



**Figura 2: Eletromicrografia do cultivo de epitélio ciliar suíno com *M. flocculare* (isolado 7160T).** Eletromicrografia mostrando a aderência da bactéria (indicada por seta) ao epitélio ciliar suíno. Barra de escala = 2  $\mu$ m. Adaptada de Young et al. (2000).

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

### 2.1. Justificativas

Recentemente, o genoma de *M. flocculare* foi sequenciado e permitiu a comparação com o genoma de *M. hyopneumoniae* (Siqueira et al., 2013). A organização dos genomas em grupos de genes monocistrônicos e *clusters* de CDS mostrou-se conservada entre as duas espécies. O número de CDS compartilhadas entre *M. hyopneumoniae* 7422 e *M. flocculare* é de 487, sendo o total predito para cada genoma 692 e 585 CDSs, respectivamente. A proporção de CDS que são preditas como codificadoras de proteínas de superfície, 47,5% e 44,4% para *M. flocculare* e *M. hyopneumoniae*, respectivamente, também é similar. O número de proteínas de superfície ortólogas entre estas duas espécies é cerca de 90%. O compartilhamento de CDS sugere que a patogenicidade de *M. hyopneumoniae* e a ausência de patogenicidade de *M. flocculare* pode ser explicada de maneira qualitativa, através de domínios presente em proteínas.

Diferenças na virulência entre espécies podem ser associadas à presença de variantes nas proteínas de superfície através de domínios funcionais associados a características como capacidade de adesão ou antigenicidade (Siqueira et al., 2013). Análises comparativas de domínios diferenciais ficaram restritas a diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae*, como identificação de VNTRs (de Castro et al., 2006) e para *M. flocculare* apenas na adesina P97 (Siqueira et al., 2013). A presença de domínios diferenciais no repertório de proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* pode indicar sua relevância para a patogenicidade.

Portanto, a identificação de domínios diferenciais através de uma análise comparativa de proteínas de superfície entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* poderá indicar diferenças estruturais e imunológicas entre estas proteínas. Tais diferenças poderão contribuir para explicar, pelo menos em parte, o caráter patogênico de *M. hyopneumoniae* e o não patogênico de *M. flocculare*. A análise da resposta imune induzida por estes domínios se justifica pelo envolvimento da imunidade do hospedeiro ser determinante de patogenicidade.

## **2.2. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi identificar e caracterizar imunologicamente domínios proteicos diferenciais entre proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*.

## **2.3. Objetivos específicos**

- Identificar domínios diferenciais em proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* através de uma análise *in silico*.
- Avaliar comparativamente a resposta imune humoral e celular de camundongos em resposta aos domínios diferenciais de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Análise *in silico* de proteínas de superfície ortólogas

As proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* foram preditas por Siqueira et al. 2013. As sequências primárias de aminoácidos das proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* foram coletadas do banco de dados do NCBI. Cada par de proteínas de superfície ortólogas foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW disponível no software MEGA 5.05, num total de 184 pares de proteínas de superfície analisadas. Domínios diferenciais foram definidos como inserção ou deleção de 5 aminoácidos ou mais e/ou sequências de no mínimo 10 aminoácidos com 30% ou menos de similaridade, entre regiões de alta similaridade (acima de 70%). A topologia das proteínas foi predita utilizando os programas TopPred 1.10 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) e TMHMM server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Foram consideradas aquelas topologias em que a localização da região transmembrana, extracelular e intracelular da proteína foram iguais em, no mínimo, dois dos três programas.

Domínios de ligação a heparina foram definidos como X[KRH](2)X[KRH]X e X[KRH](3)X(2)[KRH]X conforme Cardin & Weintraub, 1989), sendo X qualquer aminoácido e denominadas domínio de ligação à heparina 1 e 2, respectivamente. A identificação destes domínios nas proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* foram realizadas usando o programa PATMATDB ([http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/emboss.pl?\\_action=input&\\_app=patmatdb](http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=patmatdb)).

#### 3.2. Linhagens bacterianas e condições de cultivo

*M. hyopneumoniae* 7448, precedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), foi isolado de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil

(Vasconcelos et al., 2005). *M. flocculare* (ATCC 27716) foi adquirido da American Type Culture Collection. O cultivo de ambas as espécies foi feito em 5 mL de meio Friis líquido (Friis, 1975) a 37°C por 48 h, sob leve agitação.

### **3.3. Extração de DNA genômico de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare***

O DNA genômico de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* foi extraído a partir de 5 mL de cultivo, segundo protocolo descrito por Siqueira et al. (2013). As quantidades totais de DNA tipicamente recuperadas eram de aproximadamente 5 a 7 µg.

### **3.4. Amplificação de sequências-alvo e clonagem em vetor de expressão**

Iniciadores específicos foram utilizados para amplificar, por PCR, a partir de DNA genômico, as sequências codificadoras dos domínios diferenciais do par de ortólogos MHP7448\_0612 (MHP612<sub>67-169</sub>) e MF\_00357 (MF357<sub>67-197</sub>). Nas extremidades 5' e 3' de cada iniciador foram adicionados 20 e 24 nt, respectivamente, homólogos ao sítio de policlonagem do vetor pGEX-4T-3 (GE Healthcare). As sequências e as temperaturas de anelamento (Ta) dos iniciadores utilizados estão descritas na Tabela 1. A clonagem dos amplicons no vetor foi realizada por recombinação *in vivo* em *Escherichia coli* KC8, conforme descrito por Parrish et al. (2004).

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados para amplificação das sequências nucleotídicas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare*

Nome <sup>1</sup>	Sequência (5'→3') <sup>2</sup>	Ta <sup>3</sup>
MHP612 <sub>67-169</sub> 5'	TGGTTCCGCGTGGATCCCCG <b>CTGTAACAAATTCTGAGTTT</b>	65°C
MHP612 <sub>67-169</sub> 3'	GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAT <b>TCATATTTTTTATCTCAGC</b>	65°C
MF357 <sub>67-197</sub> 5'	TGGTTCCGCGTGGATCCCCG <b>CCAGTAACAAATTCTGAATT</b>	66°C
MF357 <sub>67-197</sub> 3'	GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA <b>AGCCACACCTTGTTTGTA</b>	66°C

<sup>1</sup>Nome das CDSs selecionadas referente à anotação de Vasconcelos et al. (2005) e Siqueira et al. (2013).

<sup>2</sup>As sequências em negrito são as complementares à sequência codificadora de interesse; as demais correspondem às sequências de 20 ou 24 nt complementares ao vetor de clonagem.

<sup>3</sup>Temperatura de anelamento dos iniciadores.

### 3.5. Expressão e purificação de polipeptídeos recombinantes

Os plasmídeos recombinantes obtidos conforme descrito na Seção 3.4 foram transformados nas linhagens de *E. coli* BL21 Star (DE3) e BL21 pLysE (DE3) (Invitrogen). A expressão das proteínas recombinantes em fusão com a GST foi realizada conforme Smith & Johnson (1988). Os cultivos foram feitos em meio YT 2 X e induzidos com IPTG na concentração final de 0,1 mM, por 3 h a 28°C ou por 6 h a 37°C. Após a indução, os extratos proteicos bacterianos foram submetidos a sonicação (sonicador VC601 Sonic and Materials Inc.) em banho de gelo por 6 ciclos de 30 s e centrifugados a 20.000 x g para separação das frações solúvel e insolúvel. A expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade em resina de glutationa-Sepharose (GE Healthcare), conforme indicado pelo fabricante. As frações solúveis dos extratos bacterianos foram incubadas com a resina por 16 h a 4°C e, para a recuperação das proteínas recombinantes livres de GST, as proteínas de fusão foram clivadas com 50 U de trombina (Sigma-



Aldrich). As proteínas foram quantificadas através do sistema Qubit (Quant-iT Protein Assay Kit, Invitrogen) e armazenadas em PBS 1 X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), a -20°C. A eficiência da clivagem e a recuperação das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 15%.

### **3.6. Imunização de camundongos**

Camundongos da linhagem BALB/c com 6-10 semanas de idade foram imunizados via intraperitoneal com 25 µg de cada antígeno recombinante purificado, 10 µg de lipossalicarídeo (LPS) (Sigma) e PBS 1 X, em volume final de 200 µl por camundongo. Os grupos experimentais foram formados por 8 animais e os animais foram imunizados (grupos 1 e 2) com os polipeptídeos recombinantes de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, respectivamente (ver Seções 3.4 e 3.5), ou apenas com 10 µg de LPS e PBS 1X (grupo controle). Três imunizações foram feitas em intervalos de 15 dias, e 60 dias após a primeira imunização, os animais sofreram eutanásia. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (Projeto nº 25857).

### **3.7. Análise da resposta imune humoral**

Os níveis de anticorpos induzidos pelos polipeptídeos recombinantes foram determinados por ELISA indireto, conforme descrito por Virginio et al. (2003), com algumas modificações. Placas de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com 0,4 µg/poço de polipeptídeo recombinante correspondente. Para a determinação do título, os soros dos animais pré-imune e 45 DPI com os polipeptídeos recombinantes e somente LPS foram utilizados. A diluição seriada partiu de um título de 1000 até 128000. Após a titulação dos soros, para a análise da resposta imune humoral individual dos animais, os soros foram diluídos 1:16000 e testados em triplicata. Como anticorpo secundário, foi adicionado anti-mouse IgG conjugado a peroxidase (Sigma). As reações antígeno-anticorpo foram reveladas utilizando peróxido de hidrogênio e OPD como substrato. A densidade ótica de cada reação foi mensurada a 492 nm (OD<sub>492</sub>). Análises estatísticas e as

representações gráficas foram realizadas usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

### **3.8. Análise da resposta imune celular**

A avaliação da resposta imune celular foi feita de acordo com Virginio et al. (2014), com algumas modificações. Três camundongos machos BALB/c não imunizados foram eutanasiados e tiveram seus baços removidos. Foi realizado uma mistura dos esplenócitos dos três animais e cultivados em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina-estreptomicina/mL e 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol. Uma concentração de  $5 \times 10^6$  células foram estimuladas com 10  $\mu$ g/mL dos polipeptídeos recombinantes em 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 72 h, em triplicata. Como controle positivo o estímulo foi realizado com 10  $\mu$ g/mL de Concaivalina A e o controle negativo foi a ausência de estímulo nos esplenócitos. Os sobrenadantes dos esplenócitos estimulados foram testados para presença das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 por ELISA de captura com o kit ELISA (BD Biosciences).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Análise *in silico* de domínios diferenciais em proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare***

Proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* foram previamente preditas por Siqueira et al. (2013). Cada par de proteínas de superfície ortólogas foi alinhado e analisado, totalizando 184 pares de proteínas de superfície ortólogas analisadas. Foram estabelecidos como domínios diferenciais: (i) aquelas regiões com, no mínimo, 10 aminoácidos de extensão com 30% ou menos de similaridade, flanqueadas por regiões de maior

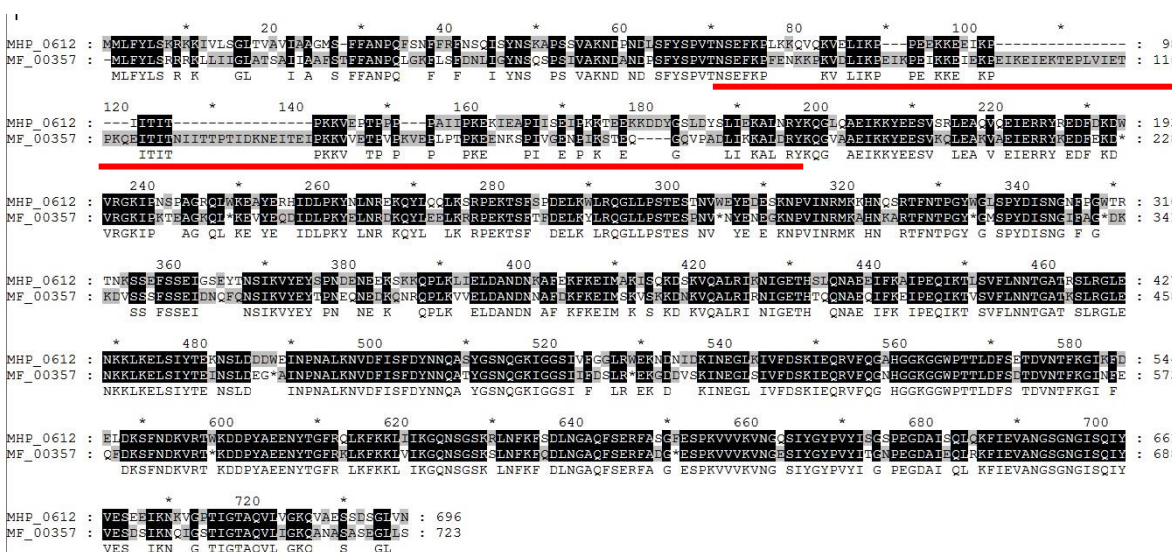
similaridade; (ii) e regiões com ausência/presença de, no mínimo, 5 aminoácidos em relação à proteína ortóloga do par.

A análise comparativa realizada entre os pares de ortólogos permitiu a identificação de 158 pares que apresentam domínios diferenciais segundo os critérios estabelecidos. O número e as posições dos domínios diferenciais identificados estão descritos na Tabela 2 (versão eletrônica). Nestes pares, de 1 a 40 domínios diferenciais foram evidenciados. Para 26 pares de ortólogos não foram identificados domínios diferenciais. Das 26 proteínas de superfície ortólogas sem domínios diferenciais, 15 possuíam função anotada e 11 foram anotadas como proteínas hipotéticas (Siqueira et al., 2013; Vasconcelos et al., 2005).

A adesão à moléculas da matriz extracelular do suíno e ao epitélio ciliar é um passo crucial para infecção e considerado um mecanismo de patogenicidade. Os pares de ortólogos foram analisados contra a presença de domínios de ligação à heparina para avaliar se os domínios diferenciais podem estar relacionados com domínios envolvidos com patogenicidade. Do total de proteínas de superfície ortólogas preditas, 135 e 130 proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare*, respectivamente, apresentaram domínios de ligação à heparina. O domínio de ligação à heparina encontrou-se nos domínios diferenciais em 35 proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 (Tabelas 3B, versão eletrônica) e em 34 proteínas de *M. flocculare* (Tabela 3A, versão eletrônica).

Para avaliação preliminar da possível relevância imunológica de domínios diferenciais ortólogos de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, foi selecionado um par de proteínas de superfície ortólogas. Usando critérios mais estridentes, a saber: (i) domínio diferencial se estendendo por mais de 50 aminoácidos; e (ii) localização do domínio diferencial na região extracelular das proteínas. Segundo estes critérios, a identificação se restringiu a 3 pares de proteínas ortólogas: MHP7448\_0612 e MF\_00357, MHP7448\_0094 e MF\_00500 e MHP7448\_0556 e MF\_00306 (dados não mostrados). As proteínas hipotéticas MHP7448\_0612 de *M. hyopneumoniae* 7448 e a ortóloga em *M. flocculare* MF\_00357 foram então selecionadas arbitrariamente para os experimentos de avaliação imunológica comparativa posteriores.

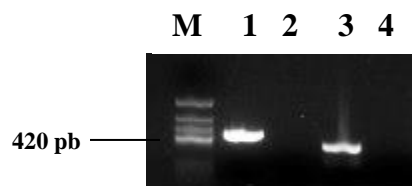
A região selecionada para clonagem e expressão dos domínios diferenciais foi do aminoácido 67 a 169 e 67 a 197 das proteínas MHP7448\_0612 (MHP612<sub>67-169</sub>) e MF\_00357 (MF357<sub>67-197</sub>), respectivamente. As sequências nucleotídicas correspondentes aos domínios apresentaram 306 pb para MHP612<sub>67-169</sub> e 393 pb para MF357<sub>67-197</sub>. A região do domínio diferencial apresentou 35% de homologia flanqueada pela região N-terminal com 70% de homologia e C-terminal com 85% de homologia. O alinhamento das duas proteínas ortólogas está mostrado na Figura 3 e a região do domínio diferencial está salientada em vermelho. Os programas utilizados para a predição da topologia das proteínas indicaram uma região transmembrana da região compreendida entre os aminoácidos de 12 a 30 e 12 a 32, na proteína MHP7448\_0612 e uma região transmembrana nos aminoácidos 12 a 34 e 11 a 31, na proteína MF\_00357 (dados não mostrados). As regiões C-terminais de ambas proteínas, a partir das respectivas regiões transmembrana, foram preditas como extracelulares.



**Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* (MHP7448\_0612) e *M. flocculare* (MF\_00357). O domínio diferencial selecionado para clonagem e expressão em *E. coli* esta indicado em vermelho.**

## 4.2. Expressão dos domínios diferenciais ortólogos de MHP612<sub>67-169</sub> e MF357<sub>67-197</sub>

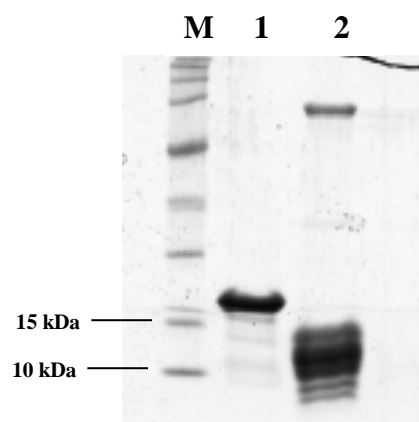
Os domínios MHP612<sub>67-169</sub> e MF357<sub>67-197</sub> foram expressos em *E. coli* para produção dos polipeptídeos recombinantes rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>, respectivamente. Os *amplicons* clonados (Figura 4), de 350 pb e 437 pb incluíram os domínios diferenciais de 306 pb e 393 pb de MHP774\_0612 e MF\_00357, respectivamente mais 44 pb homólogos ao vetor de clonagem.



**Figura 4. Produtos de amplificação das sequências nucleotídicas dos domínios diferenciais da MHP7448\_0612 e MF\_00357.** Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Amostras 1 e 3: Produtos de PCR contendo as sequências dos domínios diferenciais da MF\_00357 e MHP7448\_0612, respectivamente, mais 44 pb homólogos ao vetor de expressão pGEX-4T-3; Amostras 2 e 4: Controles negativos de amplificação (sem DNA-molde) das reações 1 e 3; M: marcadores de tamanho (pb) indicado no lado esquerdo da figura.

Os plasmídeos recombinantes resultantes da clonagem por recombinação *in vivo*, pGEX-4T-3:MHP612<sub>67-169</sub> e pGEX-4T-3:MF357<sub>67-197</sub>, foram utilizados para a transformação de células de *E. coli*. A linhagem *E. coli* BL21 Star (DE3) foi selecionada para a expressão da GST- rMHP612<sub>67-169</sub> e a BL21 pLysE (DE3) para a expressão da GST-rMF357<sub>67-197</sub>. As diferentes linhagens de *E. coli* utilizadas produziram as proteínas de fusão recombinantes com as massas esperadas de 37,4 kDa para GST- rMHP612<sub>67-169</sub> e 40 kDa para GST-rMF357<sub>67-197</sub>. Nos testes de solubilidade, a indução a 28°C por 3 h foi mais favorável à obtenção do polipeptídeo GST- rMHP612<sub>67-169</sub> na fração solúvel do que a indução a 37°C. O polipeptídeo GST-rMF357<sub>67-197</sub> foi obtido na fração solúvel após a indução a 37°C por 6 h.

As proteínas GST-rMHP612<sub>67-169</sub> e GST-rMF357<sub>67-197</sub> foram purificadas por cromatografia de afinidade, apresentando, em SDS-PAGE, as massas moleculares esperadas de 11,4 kDa e 14 kDa, respectivamente (Figura 5). A análise por SDS-PAGE 15% da purificação das proteínas de fusão indicou que o polipeptídeo rMF357<sub>67-197</sub> foi recuperado livre de proteínas contaminantes. Já o polipeptídeo rMHP612<sub>67-169</sub> foi recuperado com a contaminação da proteína de *E. coli* DnaK (70 kDa), mas em menor representatividade, como descrito no manual do fabricante da coluna de afinidade Glutathione Sepharose® (GE Healthcare). Um total de 2 mg do polipeptídeo rMHP612<sub>67-169</sub> e 6,4 mg do polipeptídeo rMF357<sub>67-197</sub> foram recuperados a partir de 1 L de cultura. A sequência dos polipeptídeos recombinantes foi confirmada por espectrometria de massas.



**Figura 5. Análise eletroforética dos polipeptídeos rMF357<sub>67-197</sub> e rMHP612<sub>67-169</sub> purificados.** Os polipeptídeos recombinantes foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 15%. Amostra 1: Eluição do polipeptídeo rMF357 (14 kDa) livre de GST; Amostra 2: Eluição do polipeptídeo rMHP612 (11,4 kDa) livre de GST. M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. Os géis foram corados com Coomassie R-250.

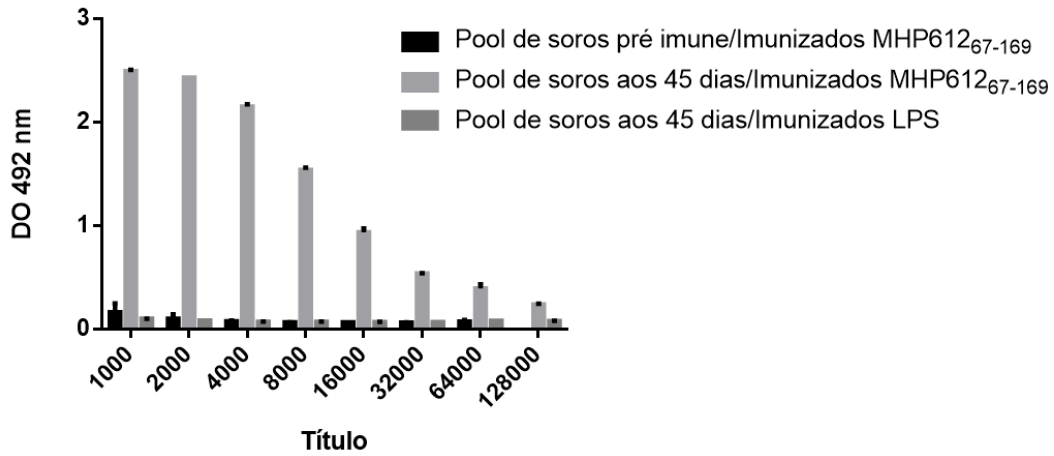
#### **4.3. Avaliação da resposta imune em camundongos induzida pelos polipeptídeos rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>**

Devido à importância da resposta imune do hospedeiro na patogênese por *M. hyopneumoniae*, a resposta imune humoral e celular de camundongos induzida pelos domínios diferenciais recombinantes foi avaliada. Para avaliar a resposta imune humoral, os polipeptídeos rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>, disponíveis na

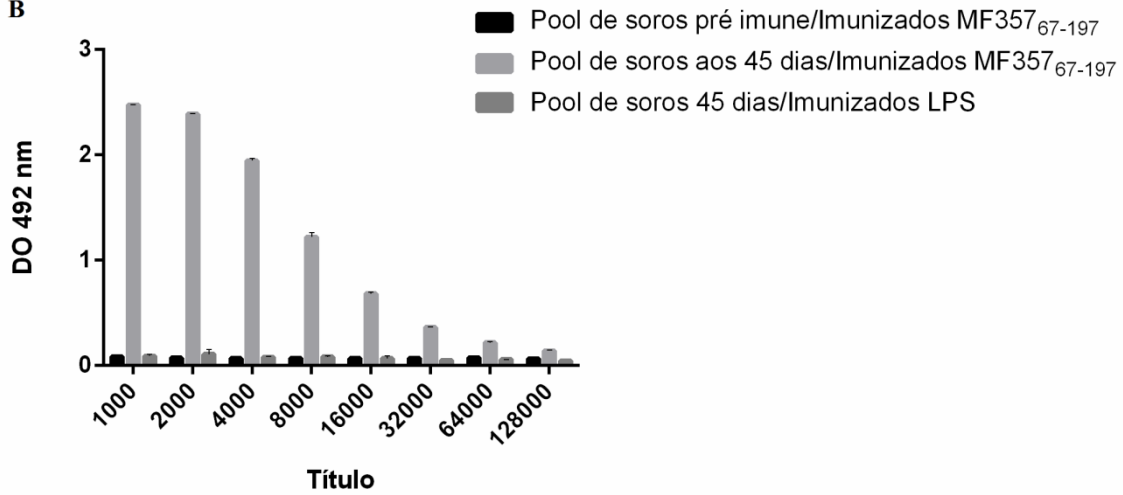
forma livre de GST, foram utilizados como antígenos na imunização de camundongos. Foram realizadas 3 imunizações no intervalo de 15 dias, e o sangue dos animais foi coletado também 15 dias após cada imunização. LPS foi utilizado como adjuvante e um grupo foi imunizado apenas com LPS como controle. A padronização do título dos níveis de IgG específico foi realizada com as amostras de soros pré-imune e 45 dias após a primeira imunização dos camundongos imunizados com os polipeptídeos recombinantes rMHP612<sub>67-169</sub> ou rMF357<sub>67-197</sub> ou LPS. A diluição seriada partiu de um título de 1000 até 128000 (Figura 6). O título 16000 foi utilizado na análise da resposta imune humoral individual de cada animal em todos os grupos.

Os animais imunizados produziram altos níveis de IgG contra os polipeptídeos rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub> detectáveis 30 dias após a primeira imunização ( $P \leq 0,01$ ), comparado com o grupo controle. A resposta imune continuou constante 45 dias após a primeira imunização (Figura 7). No entanto, quando comparado os níveis de IgG entre os animais imunizados com rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub> não houve diferença significativa.

A

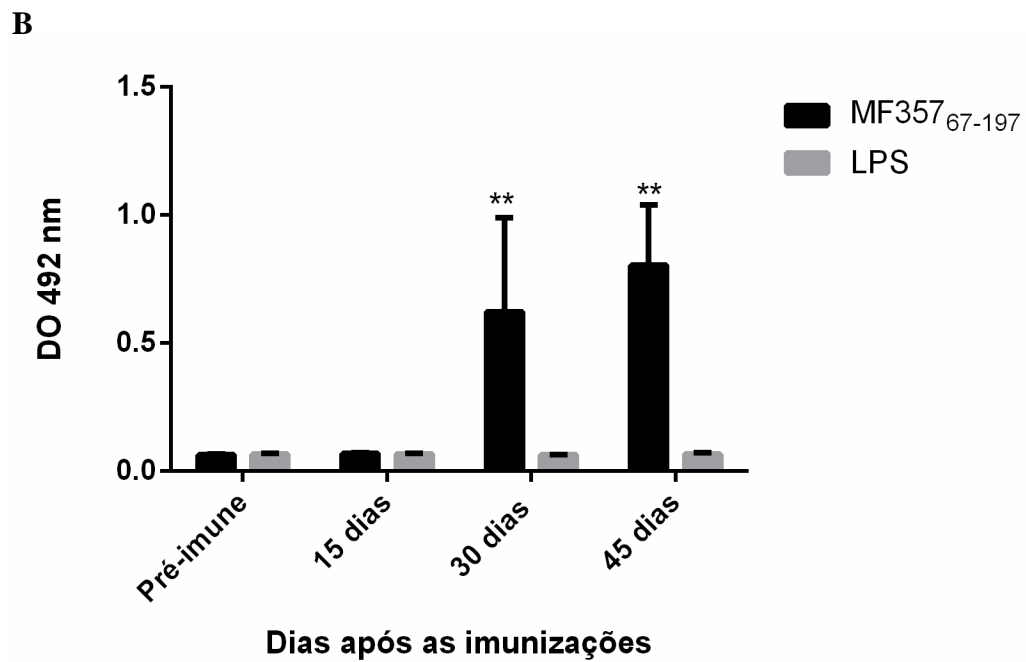
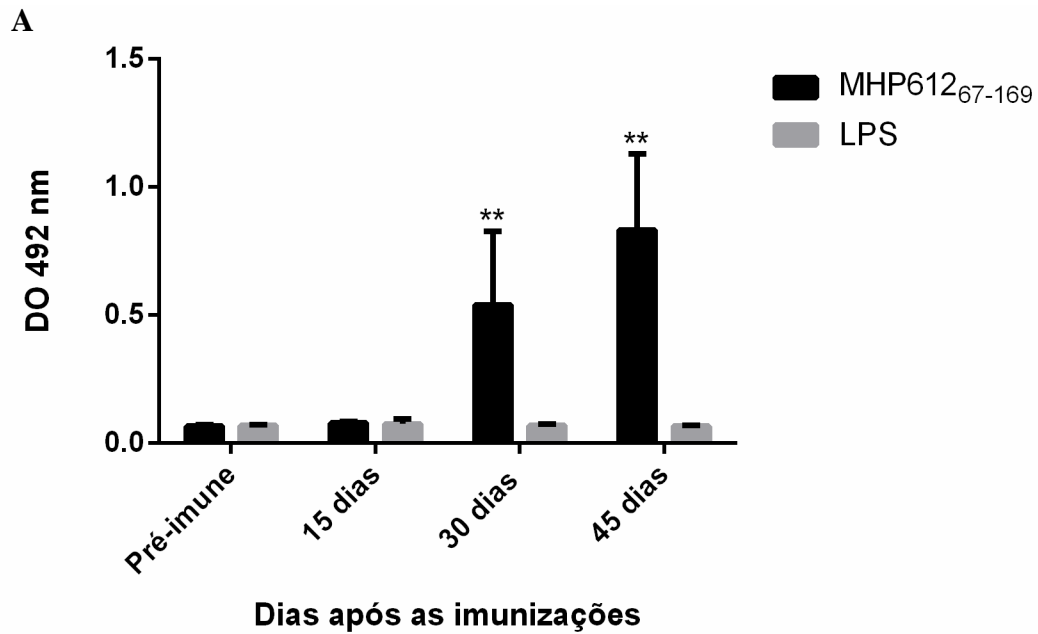


B



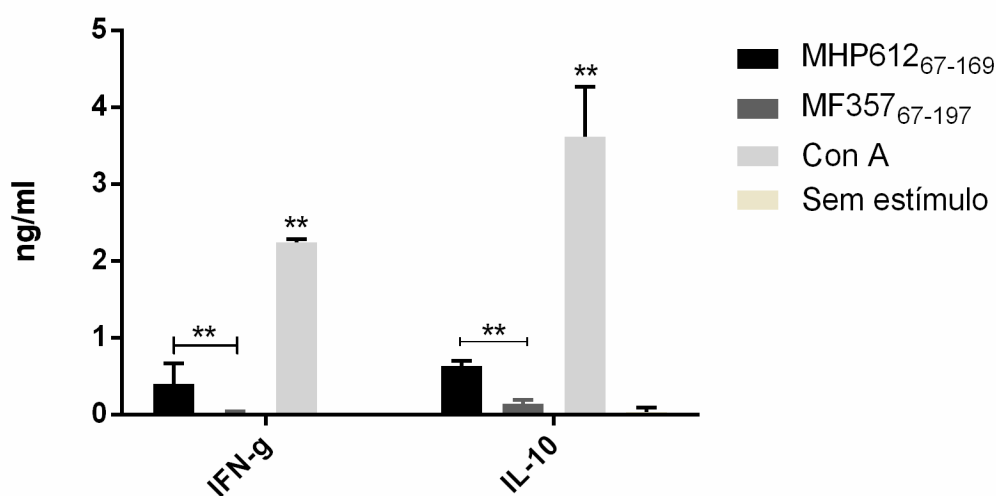
**Figure 6. Padronização do título dos níveis de IgG específico no soro de camundongos imunizados com os polipeptídeos recombinantes rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub> e LPS determinados por ELISA indireto.** Os dados representam a densidade óptica a 492 nm ( $\pm$  DP) de diferentes títulos (1000 a 128000) do pool de soros de 8 camundongos em cada grupo (Soro pré-imune e 45 DPI) imunizados com rMHP612<sub>67-169</sub> e LPS (A) e rMF357<sub>67-197</sub> e LPS (B).





**Figure 7. Níveis de IgG específico no soro de camundongos imunizados com os polipeptídeos recombinantes rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub> determinados por ELISA indireto.** Os dados representam a densidade óptica a 492 nm ( $\pm$  DP) de 8 camundongos em cada grupo imunizados com rMHP612<sub>67-169</sub> (A) e rMF357<sub>67-197</sub> (B). Os asteriscos indicam diferença significativa (\*\* $P \leq 0,001$ ) quando comparado os níveis de IgG dos grupos imunizados com os polipeptídeos recombinantes e LPS e o grupo imunizado apenas com LPS.

A resposta imune celular em camundongos também foi avaliada. Os esplenócitos de 3 camundongos machos não imunizados foram estimulados com os polipeptídeos recombinantes. Os níveis das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram mensurados por ELISA de captura. O estímulo dos esplenócitos com rMHP612<sub>67-169</sub> induziu mais níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  ( $P \leq 0,001$ ) do que em relação aos níveis induzidos por rMF357<sub>67-197</sub> (Figura 8). Não foram detectados níveis de IL-4 nos esplenócitos estimulados com os polipeptídeos recombinantes.



**Figura 8. Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com os polipeptídeos rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>.** Avaliação por ELISA de captura das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 secretadas por esplenócitos de camundongos estimulados com rMHP612<sub>67-169</sub>, rMF357<sub>67-197</sub>, concavalina A e ausência de estímulo. A concentração de citocinas está indicada em nanogramas por mL de cultivo. Os asteriscos indicam diferença significativa (\*\* $P \leq 0,001$ ) quando comparado a concentração de citocinas (IFN- $\gamma$  ou IL-10) produzidas em esplenócitos estimulados com os polipeptídeos recombinantes.

## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos 10 anos, os genomas de várias linhagens de *M. hyopneumoniae* (232, J, 7448, 168 e 7442) (Liu et al., 2011; Minion et al., 2004; Siqueira et al., 2013; Vasconcelos et al., 2005) e de um isolado de *M. flocculare* (ATCC 27716) (Siqueira et al., 2013) foram sequenciados. A disponibilidade das

sequências genômicas permitiu a análise comparativa de diferentes linhagens patogênicas e não patogênicas de *M. hyopneumoniae* utilizando abordagens genômicas *in silico* (Liu et al., 2013) e proteômicas (Pinto et al., 2009; Reolon et al., 2014). Análises *in silico* e validação experimental identificaram números variáveis de repetições em tandem de aminoácidos VNTRs em diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae* (de Castro et al., 2006). Em estudos de genômica comparativa mais abrangentes, como o de Siqueira et al. (2013), também foram evidenciadas diferenças qualitativas entre os repertórios de proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*.

Aproximadamente um terço de todas as proteínas bacterianas estão na membrana plasmática ou são exportadas para fora da célula (Auclair et al., 2012), mesmo no caso de bactérias com genomas reduzidos, como as micoplasmas (Siqueira et al., 2013). *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* compartilham cerca de 70% de suas CDS totais e cerca de 90% de seus repertórios de proteínas de superfície (Siqueira et al., 2013). Considerando apenas os 30% de proteínas exclusivas de uma ou outra espécie, é possível que a diferença na patogenicidade não seja determinada só a isso, mas também a diferenças funcionais entre ortólogos.

*M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* possuem um total de 184 proteínas de superfície de ortólogos. Dentre estas proteínas, 158 pares apresentaram diferenças segundo critérios estabelecidos por este trabalho. A presença de domínios em cerca de 85% dos pares de ortólogos sugere que esses domínios podem desempenhar um papel funcional. Domínios de ligação em proteínas de *M. hyopneumoniae* à matriz extracelular do suíno já foram identificados e relacionados com a patogenicidade (Seymour et al., 2012; Woolley et al., 2013; Deutscher et al., 2010; Raymond et al., 2014). No entanto, a análise de domínios, até o momento, se restringiu a poucas proteínas e na análise global deste trabalho, foi demonstrado que a maioria das proteínas de superfície indicam a presença de domínios.

A heparina é um glicosaminoglicano essencial da matriz extracelular em pulmões de suínos (Erlinger, 1995). A ligação de proteínas de superfície à

heparina parece desempenhar um papel importante na colonização do epitélio ciliar respiratório, e as regiões R1 e R2 da adesina P97 mostraram capacidade de ligação à heparina (Jenkins et al., 2006), bem como as proteínas P216, P159 e parálogo de P97 (Mhp107) (Burnett et al., 2006; Deutscher et al., 2010; Wilton et al., 2009). Dentre as proteínas de superfície ortólogas, 135 e 130 proteínas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, respectivamente apresentaram domínio de ligação à heparina. Em 35 e 34 proteínas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, respectivamente, o domínio de ligação à heparina encontrou-se na região do domínio diferencial. A presença do domínio de ligação à heparina em um domínio diferencial sugere que os domínios diferenciais podem interferir em domínios relacionados com a patogenicidade.

Os domínios diferenciais das proteínas hipotéticas MHP7448\_0612 e MF\_00357 foram selecionados para avaliar seu papel na resposta imune de camundongos. A seleção foi baseada no tamanho e na localização extracelular do domínio diferencial nas proteínas. Ambas proteínas hipotéticas foram preditas com base no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 (Vasconcelos et al., 2005) e *M. flocculare* (Siqueira et al., 2013). A transcrição dos genes correspondentes a estas proteínas em meio de cultivo foi descrita por Siqueira et al., (2014), confirmando a predição realizada previamente.

As linhagens celulares de *E. coli* DE3 são otimizadas para a expressão de sistemas controlados pelo promotor do fago T7. No entanto, em ensaios de rendimento e solubilidade, quando comparadas as outras linhagens não DE3 disponíveis no laboratório (BL21-CodonPlus-RIL e BL21-CodonPlus-RP), estas demonstraram maximização do rendimento e solubilidade dos polipeptídeos recombinantes. O uso de uma baixa temperatura de indução (28°C) para o polipeptídeo rMHP612<sub>67-169</sub> influenciou a produção na sua forma solúvel, nas diferentes linhagens de *E. coli*. Temperaturas baixas favorecem o estado nativo de proteínas recombinantes devido à diminuição na taxa de síntese proteica e mudanças na cinética do dobramento da cadeia polipeptídica (Georgiou & Valax, 1996).

*E. coli* é o organismo de escolha para a produção de proteínas recombinantes, por possuir a capacidade de produzir e purificar proteínas em grandes quantidades (Rosano & Ceccarelli, 2014). Um fator limitante para a produção de proteínas de micoplasmas em *E. coli* é o fato do códon do triptofano em micoplasmas ser o equivalente ao códon de parada em *E. coli* (Iriarte et al., 2011), produzindo, desse modo, proteínas truncadas. Para superar este obstáculo, uma metodologia de mutagênese sítio dirigida foi desenvolvida (Simionatto et al., 2009). No entanto, a região dos domínios diferenciais selecionadas para clonagem e expressão não apresentaram o códon do triptofano.

A avaliação de resposta imune de camundongos contra antígenos recombinantes é uma alternativa para ensaios preliminares de antigenicidade e imunogenicidade. Antígeno recombinantes de *M. hyopneumoniae* que foram imunogênicos em camundongos demonstraram antigenicidade quando testados contra soros de suínos naturalmente infectados (Moitinho-Silva et al., 2012; Galli et al., 2013). O aumento dos níveis de IgG e a produção de IL-10 também foram semelhantes em experimentos independentes em camundongos e suínos imunizados com a proteína recombinante Hsp70 (P42) (Jorge et al., 2014; Virginio et al., 2014). Níveis de IgG e IgA também foram similares em camundongos e suínos imunizados com uma proteína quimérica (Marchioro et al., 2014). Tanto a resposta imune humoral como a resposta imune celular se mantêm similares entre camundongos e suínos, e podem, em parte, ser extrapoladas entre as duas espécies.

*M. flocculare* é uma bactéria comensal e, não foi observado dano ao hospedeiro decorrente da sua presença (Kobisch & Friis, 1996). *M. flocculare* é capaz de induzir a produção de anticorpos em suínos (Neto et al., 2014), que apresentam reação cruzada com antígenos de *M. hyopneumoniae* (Bereiter et al., 1990). Ambos os polipeptídeos recombinantes induziram resposta humoral em camundongos, mas não houve diferença significativa entre os níveis de IgG. No entanto, a resposta imune humoral na infecção por *M. hyopneumoniae*, não é indicador para a colonização ou severidade da doença (Andreasen et al., 2000; Fano et al., 2012).

A patogênese e os fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* ainda não estão totalmente elucidados, mas, a adesão ao epitélio respiratório do organismo, a estimulação de uma resposta inflamatória e a supressão e modulação da resposta imune inata e adaptativa são reconhecidas como passos importantes para colonização e infecção (Thacker & Minion, 2010). A infecção por *M. hyopneumoniae* induz a expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-18 e TNF- $\alpha$  (Choi et al., 2006; Damte et al., 2011; Muneta et al., 2008; Woolley et al., 2012) que desencadeiam no hospedeiro uma resposta do tipo Th17, Th1 e Th2, respectivamente.

O domínio diferencial rMHP612<sub>67-169</sub> também foi capaz de induzir IFN- $\gamma$ , uma citocina pró-inflamatória, semelhante ao que ocorre na infecção por *M. hyopneumoniae*, e também IL-10, uma citocina anti-inflamatória. IFN- $\gamma$  e IL-10 desencadeiam resposta do tipo Th1 e Th2, respectivamente, sugerindo que o domínio diferencial rMHP612<sub>67-169</sub> desempenha um papel semelhante ao encontrado pela infecção natural no hospedeiro, visto que rMF357<sub>67-197</sub> não induziu estas citocinas. A indução de respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é mediada, pelo menos em parte, por vias de sinalização distintas, mas conectadas pelo mesmo complexo de receptores (Levast et al., 2014), o que pode explicar a indução dessas duas vias por *M. hyopneumoniae* e rMHP612<sub>67-169</sub>. Camundongos vacinados com subunidades recombinantes de *M. hyopneumoniae* também induziram a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 (Virginio et al., 2014; Chen et al., 2008) e IL-1 e TNF- $\alpha$  (Galli et al., 2012). No entanto, é a primeira vez que a resposta imune contra uma subunidade recombinante de *M. flocculare* é descrita.

Outro aspecto crucial para o estabelecimento da infecção por *M. hyopneumoniae* é a aderência ao epitélio ciliar dos brônquios e bronquíolos (DeBey & Ross, 1994). A região repetitiva R1 da adesina P97 é responsável pela aderência ao epitélio ciliar (Hsu & Minion, 1998), e um mínimo de 8 repetições são necessárias para a ligação (Minion et al., 2000). *M. flocculare* também se adere ao epitélio ciliar, porém sua presença é virtualmente assintomática (Meyling & Friis, 1972), e possui ortólogos para todas as adesinas de *M. hyopneumoniae* 7448, com exceção de uma cópia da P97 (Siqueira et al., 2013). O ortólogo de P97 cópia

2 não possui o domínio R1, sugerindo que diferenças na virulência entre estas espécies podem ser associadas a presença de variantes nas proteínas, com ausência ou presença de domínios funcionais. Como evidenciado pela P97, domínios diferenciais podem estar envolvidos na patogenicidade através da adesão de *M. hyopneumoniae* às células do hospedeiro. Desse modo, além da análise imunológica dos domínios diferenciais, a análise do papel destes domínios na adesão também é importante.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho identificaram domínios diferenciais em 85% das proteínas de superfície ortólogas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Além disso, esses domínios diferenciais podem afetar outros domínios relacionados com a patogenicidade, como domínio de ligação à heparina. Para avaliar a resposta imune em camundongos, o domínio diferencial de um par de proteínas de superfície ortólogas, as proteínas hipotéticas MHP7448\_0612 e MF\_00357 foi selecionada. Para os ensaios imunológicos, este trabalho disponibilizou as versões recombinantes dos domínios diferenciais rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>. Os níveis de IgG total não mostraram diferenças em camundongos imunizados com rMHP612<sub>67-169</sub> e rMF357<sub>67-197</sub>, mas o polipeptídeo recombinante rMHP612<sub>67-169</sub> induziu mais a secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10. Esses resultados sugerem que os domínios diferenciais induzem uma resposta imune celular diferencial em camundongos e podem possuir um papel na patogênese de *M. hyopneumoniae*.

Como perspectivas, avaliar a resposta imune humoral e celular de suínos contra as versões recombinantes dos domínios diferenciais, para confirmar as propriedades imunológicas diferenciais. Além disso, avaliar a resposta imune de novos pares de domínios diferenciais para identificar se as diferenças na resposta imune celular se mantêm com outros domínios. O papel dos domínios na virulência poderá ser avaliado através de mutantes, utilizando sistema de transposon, com posterior infecção experimental em suínos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreasen, M., Nielsen, J.P., Baekbo, P., Willeberg, P., Bøtner, A., 2000. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev Vet Med* 45, 221-235.
- Auclair, S.M., Bhanu, M.K., Kendall, D.A., 2012. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* 21, 13-25.
- Baseman, J.B., Lange, M., Criscimagna, N.L., Giron, J.A., Thomas, C.A., 1995. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* 19, 105-116.
- Bereiter, M., Young, T.F., Joo, H.S., Ross, R.F., 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet Microbiol* 25, 177-192.
- Bogema, D.R., Scott, N.E., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Raymond, B.B., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2011. Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem* 286, 41217-41229.
- Bové, J.M., 1993. Molecular features of mollicutes. *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1, S10-31.
- Burnett, T.A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Uphoff, C., Srivastava, M., Cordwell, S.J., Geary, S., Liao, X., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol* 60, 669-686.
- Bébéar, C., Pereyre, S., Peuchant, O., 2011. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol* 6, 423-431.
- Cardin, A.D., Weintraub, H.J., 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21-32.



- Chambaud, I., Wróblewski, H., Blanchard, A., 1999. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol* 7, 493-499.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Forbes-Faulkner, J., Daggard, G.E., Mukkur, T.K., 2006. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* *aroA* in mice. *Vet Microbiol* 114, 252-259.
- Choi, C., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Lee, Y.H., Kim, O., Park, H.K., Kim, S.H., Hwang, K.K., Chae, C., 2006. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol* 134, 40-46.
- Citti, C., Nouvel, L.X., Baranowski, E., 2010. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* 5, 1073-1085.
- Conceição, F.R., Moreira, A.N., Dellagostin, O.A., 2006. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 24, 5734-5743.
- Damte, D., Lee, S.J., Hwang, M.H., Gebru, E., Choi, M.J., Lee, J.S., Cheng, H., Park, S.C., 2011. Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. *N Z Vet J* 59, 185-190.
- de Castro, L.A., Rodrigues Pedroso, T., Kuchiishi, S.S., Ramenzoni, M., Kich, J.D., Zaha, A., Henning Vainstein, M., Bunselmeyer Ferreira, H., 2006. Variable number of tandem amino acid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Microbiol* 116, 258-269.
- DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62, 5312-5318.
- Deutscher, A.T., Jenkins, C., Minion, F.C., Seymour, L.M., Padula, M.P., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2010. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Mol Microbiol* 78, 444-458.
- Erlinger, R., 1995. Glycosaminoglycans in porcine lung: an ultrastructural study using cupromeronic blue. *Cell Tissue Res* 281, 473-483.

- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J., 2012. Longitudinal assessment of two *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays in challenged and contact-exposed pigs. *J Vet Diagn Invest* 24, 383-387.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A., Venter, J.C., 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397-403.
- Friis, N.F., 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27, 337-339.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2012. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine* 31, 135-140.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S.B., Klabunde, G.H., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2013. Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. *Clin Vaccine Immunol* 20, 1370-1376.
- Georgiou, G., Valax, P., 1996. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7, 190-197.
- Hsu, T., Minion, F.C., 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 66, 4762-4766.
- Iriarte, A., Baraibar, J.D., Romero, H., Musto, H., 2011. Selected codon usage bias in members of the class Mollicutes. *Gene* 473, 110-118.
- Jenkins, C., Wilton, J.L., Minion, F.C., Falconer, L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2006. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun* 74, 481-487.
- Jorge, S., de Oliveira, N.R., Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Hartleben, C.P., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2014. The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune

- response in pigs under field conditions. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37, 229-236.
- Kim, J.H., Cho, T.S., Moon, J.H., Kim, C.R., Oh, J.W., 2014. Serial Changes in Serum Eosinophil-associated Mediators between Atopic and Non-atopic Children after *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Allergy Asthma Immunol Res* 6, 428-433.
- Kobisch, M., Friis, N.F., 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* 15, 1569-1605.
- Levast, B., Li, Z., Madrenas, J., 2014. The role of IL-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance. *Cytokine*.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G., Xiao, S., 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J Bacteriol* 193, 1016-1017.
- Liu, W., Xiao, S., Li, M., Guo, S., Li, S., Luo, R., Feng, Z., Li, B., Zhou, Z., Shao, G., Chen, H., Fang, L., 2013. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics* 14, 80.
- Liu, Y.C., Lin, I.H., Chung, W.J., Hu, W.S., Ng, W.V., Lu, C.Y., Huang, T.Y., Shu, H.W., Hsiao, K.J., Tsai, S.F., Chang, C.H., Lin, C.H., 2012. Proteomics characterization of cytoplasmic and lipid-associated membrane proteins of human pathogen *Mycoplasma fermentans* M64. *PLoS One* 7, e35304.
- Livingston, C.W., Stair, E.L., Underdahl, N.R., Mebus, C.A., 1972. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *Am J Vet Res* 33, 2249-2258.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 126, 297-309.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q* 18, 104-109.
- Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Jorge, S., Galli, V., Haesebrouck, F., Maes, D., Dellagostin, O., Conceição, F.R., 2014. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing

*Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT<sub>B</sub>. *Vet Microbiol* 173, 166-171.

Meyling, A., Friis, N.F., 1972. Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*. *Acta Vet Scand* 13, 287-289.

Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 24, 7081-7086.

Minion, F.C., Adams, C., Hsu, T., 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 68, 3056-3060.

Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* 186, 7123-7133.

Moitinho-Silva, L., Heineck, B.L., Reolon, L.A., Paes, J.A., Klein, C.S., Rebelatto, R., Schrank, I.S., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2012. *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential. *Vet Microbiol* 154, 282-291.

Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., Ogawa, Y., Hikono, H., Mori, Y., 2008. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Vet Med Sci* 70, 1065-1070.

Muneta, Y., Uenishi, H., Kikuma, R., Yoshihara, K., Shimoji, Y., Yamamoto, R., Hamashima, N., Yokomizo, Y., Mori, Y., 2003. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J Interferon Cytokine Res* 23, 583-590.

Neto, J.C., Strait, E.L., Raymond, M., Ramirez, A., Minion, F.C., 2014. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*. *Vet Microbiol*.

Nicholas, R.A., Ayling, R.D., McAuliffe, L., 2009. Vaccines for Mycoplasma diseases in animals and man. *J Comp Pathol* 140, 85-96.

Park, S.C., Yibchok-Anun, S., Cheng, H., Young, T.F., Thacker, E.L., Minion, F.C., Ross, R.F., Hsu, W.H., 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases

- intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun* 70, 2502-2506.
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., Finley, R.L., 2004. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3, 582-586.
- Pinto, P.M., Klein, C.S., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2009. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci* 7, 45.
- Raymond, B.B., Jenkins, C., Seymour, L.M., Tacchi, J.L., Widjaja, M., Jarocki, V.M., Deutscher, A.T., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Padula, M.P., Djordjevic, S.P., 2014. Proteolytic processing of the cilium adhesin MHJ\_0194 (P123J ) in *Mycoplasma hyopneumoniae* generates a functionally diverse array of cleavage fragments that bind multiple host molecules. *Cell Microbiol*.
- Raymond, B.B., Tacchi, J.L., Jarocki, V.M., Minion, F.C., Padula, M.P., Djordjevic, S.P., 2013. P159 from *Mycoplasma hyopneumoniae* binds porcine cilia and heparin and is cleaved in a manner akin to ectodomain shedding. *J Proteome Res* 12, 5891-5903.
- Razin, S., Hayflick, L., 2010. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals* 38, 183-190.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1094-1156.
- Reolon, L.A., Martello, C.L., Schrank, I.S., Ferreira, H.B., 2014. Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach. *PLoS One* 9, e112596.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5, 172.
- Rottem, S., 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 83, 417-432.
- Rottem, S., Barile, M.F., 1993. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol* 11, 143-151.

- Sethi, S., Singh, G., Samanta, P., Sharma, M., 2012. *Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. Indian J Med Res 136, 942-955.
- Seymour, L.M., Falconer, L., Deutscher, A.T., Minion, F.C., Padula, M.P., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., 2011. Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Biol Chem 286, 10097-10104.
- Seymour, L.M., Jenkins, C., Deutscher, A.T., Raymond, B.B., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Bogema, D.R., Eamens, G.J., Woolley, L.K., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2012. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. Cell Microbiol 14, 81-94.
- Shu, H.W., Liu, T.T., Chan, H.I., Liu, Y.M., Wu, K.M., Shu, H.Y., Tsai, S.F., Hsiao, K.J., Hu, W.S., Ng, W.V., 2012. Complexity of the *Mycoplasma fermentans* M64 genome and metabolic essentiality and diversity among mycoplasmas. PLoS One 7, e32940.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Vet J 181, 221-231.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Luerce, T.D., Hartwig, D.D., Moreira, A.N., Dellagostin, O.A., 2009. Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. J Microbiol Methods 79, 101-105.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. Vet Microbiol 165, 234-242.
- Siqueira, F.M., Thompson, C.E., Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Reolon, L., Almeida, L.G., da Fonsêca, M.M., de Souza, R., Prosdociami, F., Schrank, I.S., Ferreira, H.B., de Vasconcelos, A.T., Zaha, A., 2013. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. BMC Genomics 14, 175.
- Siqueira, F.M., Gerber, A.L., Guedes, R.L., Almeida, L.G., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T., Zaha, A., 2014. Unravelling the transcriptome profile of the Swine respiratory tract mycoplasmas. PLoS One 9, e110327.

- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., Blanchard, A., 2007. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* 158, 754-766.
- Smith, D.B., Johnson, K.S., 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Stemke, G.W., Robertson, J.A., 1990. The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* based upon ATP-dependent luminometry. *Vet Microbiol* 24, 135-142.
- Thacker, E.L., Minion, C.F. 2010. Mycoplasmosis, In: Zimmerman, J. (Ed.) *Diseases of swine* Iowa state university press, 779-797.
- Thacker, E.L., 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim Health Res Rev* 5, 317-320.
- Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G., Almeida, R., Alves-Filho, L., Assunção, E.N., Azevedo, V.A., Bogo, M.R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambrós, B.P., Dellagostin, O.A., Falcão, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S., Frías, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimarães, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F., Lopes, M.I., Loreto, E.L., Madeira, H.M., Manfio, G.P., Maranhão, A.Q., Martinkovics, C.T., Medeiros, S.R., Moreira, M.A., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolás, M.F., Oliveira, S.C., Paixão, R.F., Pedrosa, F.O., Pena, S.D., Pereira, M., Pereira-Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C., Santos, F.R., Schmitt, R., Schneider, M.P., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanez, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares, C.M., Souza, K.R., Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B., Teixeira, S.M., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J., Zaha, A., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* 187, 5568-5577.
- Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Paes, J.A., Schuck, D.C., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2014. Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae*

recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. *Vaccine* 32, 5832-5838.

Virginio, V.G., Hernández, A., Rott, M.B., Monteiro, K.M., Zandonai, A.F., Nieto, A., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2003. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 132, 309-315.

Wilton, J., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Falconer, L., Minion, F.C., Oneal, D.C., Djordjevic, M.A., Connolly, A., Barchia, I., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., 2009. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol* 71, 566-582.

Woolley, L.K., Fell, S., Gonsalves, J.R., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., Jenkins, C., Eamens, G.J., 2012. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet Microbiol* 161, 186-195.

Woolley, L.K., Fell, S.A., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Jenkins, C., 2013. Plasmin activity in the porcine airways is enhanced during experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, is positively correlated with proinflammatory cytokine levels and is ameliorated by vaccination. *Vet Microbiol* 164, 60-66.

Young, T.F., Thacker, E.L., Erickson, B.Z., Ross, R.F., 2000. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol* 71, 269-279.

Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1994. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infect Immun* 62, 4367-4373.

Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 63, 1013-1019.



## ANEXO

### CURRICULUM VITAE RESUMIDO

**LEAL, FERNANDA M. A.**

#### 1. Dados pessoais

**Nome:** Fernanda Munhoz dos Anjos Leal

**Local e data de nascimento:** Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 02/07/1991

**Endereço profissional:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 Sala 210.

Agronomia – Porto Alegre, RS

91501-970, RS – Brasil

**Telefone profissional:** (51) 33087769

**E-mail:** fehleal@yahoo.com.br

#### 2. Formação acadêmica/Titulação

**2013 - Atual** Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.  
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

**2009 – 2012** Graduação em Biotecnologia.  
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Brasil.

#### 3. Estágios

**2010 – 2012** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horário: 20 h

Projeto: Desenvolvimento de teste diagnóstico para leptospirose suína através de ensaio imunoenzimático.

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico.

#### **4. Prêmios e distinções**

**2011** - Prêmio Jovem Pesquisador: 3º Lugar na Apresentação Oral na área de Ciência Agrárias, Universidade Federal de Pelotas.

#### **5. Artigos completos publicados**

MONTE, LEONARDO GARCIA; LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos; HARTWIG, DAIANE DRAWANZ; VASCONCELLOS, SÍLVIO ARRUDA; BRIHUEGA, Bibiana; DELLAGOSTIN, ODIR ANTONIO; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. Production of leptospiral LipL32 antigen in *Pichia pastoris* and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)*, v. x, p. x, 2014.

MONTE, LEONARDO G.; JORGE, Sérgio; XAVIER, MARINA A.; LEAL, Fernanda M.A.; AMARAL, MARTA G.; SEIXAS, FABIANA K.; DELLAGOSTIN, ODIR A.; HARTLEBEN, CLÁUDIA P. Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. *Acta Tropica*, v. 126, p. 164-166, 2013.

HARTLEBEN, CLÁUDIA P.; LEAL, Fernanda M. A.; MONTE, LEONARDO G.; HARTWIG, DAIANE D.; SEIXAS, FABIANA K.; VASCONCELLOS, SÍLVIO A.; BRIHUEGA, Bibiana; DELLAGOSTIN, ODIR A. Serological Analysis by Enzyme-

Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Antigen LipL32 for the Diagnosis of Swine Leptospirosis. *Current Microbiology*, v. 66, p. 106-109, 2012.

## **6. Resumos e trabalhos apresentados em congressos**

LEAL, Fernanda M. A.; MARTELLO, C. L.; VIRGINIO, Veridiana G.; REOLON, L.; SCHRANK, Irene S.; FERREIRA, Henrique B. Expression of differential extracellular domains of orthologous surface proteins from *Mycoplasma hyopenumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MARTELLO, Carolina; LEAL, Fernanda M. A.; FERREIRA, Henrique B. Immunological evaluation in mice of a *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant protein produced in LPS producing and LPS-free *Escherichia coli* strains. In: 20th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology., 2014, Blumenau. 20th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology., 2014.

PAES, J. A.; LEAL, F. M. A.; BONOTTO, R. M.; VIRGINIO, V. G.; ZAHA, A.; FERREIRA, Henrique B. FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE TYPE I SIGNAL PEPTIDASE: AN ESSENTIAL PROTEIN TO BACTERIAL CELL VIABILITY. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

LEAL, F. M. A.; MARTELLO, C. L.; VIRGINIO, Veridiana G.; REOLON, L.; SCHRANK, I.; ZAHA, A.; FERREIRA, Henrique B. IN SILICO ANALYSES OF ORTHOLOG SURFACE PROTEINS FROM MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AND MYCOPLASMA FLOCCULARE. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

MARTELLO, C. L.; LEAL, Fernanda M. A.; VIRGINIO, Veridiana G.; REOLON, L.; SCHRANK, Irene S.; FERREIRA, Henrique B./Orthologous surface proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: in silico comparison and heterologous expression of differential extracellular domains. In: 5º Congresso Nacional de Biotecnologia, 2013, Florianópolis. 5º Congresso Nacional de Biotecnologia, 2013.

LEAL, Fernanda M. A.; GARCIA MONTE, Leonardo; JORGE, Sérgio; HARTWIG, Daiane; ARRUDA VASCONCELLOS, Silvio; DELLAGOSTIN, Odir; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA LEPTOSPIROSE SUÍNA. In: IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011, Bento Gonçalves. IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011.

Sá, Gizele Lima de; LEAL, Fernanda M. A.; RIZZI, Caroline; COLLARES, Thaís Farias; BORSUK, Sibeles; AIRES, Maria Elisabeth; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NCP43 DE NEOSPORA CANINUM PARA UTILIZAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO. In: IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011, Bento Gonçalves. IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011.

XAVIER, Maria Amaral; LEAL, Fernanda M. A.; MESQUITA, João Paulo; PEREIRA, Wallace Moraes; JORGE, Sérgio; GARCIA MONTE, Leonardo; BROD, Claudiomar Soares; MOREIRA, Cecília Nunes; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. SOROPREVALÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM CÃES ERRANTES. In: IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011, Bento Gonçalves. IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011.

COLLARES, Thaís Farias; LEAL, Fernanda M. A.; SINNOTT, Francine; Sá, Gizele Lima de; BROD, Claudiomar Soares; SAMARTINO, Luis; MOREIRA, Cecília

Nunes; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. UTILIZAÇÃO DO ENSAIO DE POLARIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA (FPA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-BRUCELLA ABORTUS EM SOROS DE CÃES ERRANTES. In: IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011, Bento Gonçalves. IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011.

LEAL, Fernanda M. A.; XAVIER ; GARCIA MONTE, Leonardo; Sá, Gizele Lima de; HARTWIG, Daiane; SEIXAS, Fabiana Kommling; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LIGBREP NO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE SUÍNA. In: 20º Congresso de Iniciação Científica, 10º Mostra de Pós-Graduação e 3º Congresso de Extensão da Universidade Católica de Pelotas, 2011, Pelotas. 20º Congresso de Iniciação Científica, 10º Mostra de Pós-Graduação e 3º Congresso de Extensão da Universidade Católica de Pelotas, 2011.

LEAL, Fernanda M. A.; SINNOTT, Francine; HARTWIG, Daiane; Seixas, Fabiana Kommling ; GARCIA MONTE, Leonardo; ARRUDA VASCONCELLOS, Silvio; PINHO HARTLEBEN, Cláudia. DESENVOLVIMENTO DE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE SUÍNA. In: XX Congreso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010. p. 226-226.

LEAL, F. M. A.; SINNOTT, Francine; MESQUITA, João Paulo; MACIEL FORSTER, Karine; GARCIA MONTE, Leonardo; ALEIXO, José Antonio; PINHO HARTLEBEN, Cláudia. CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE leptospira interrogans ATRAVÉS DE IMUNODIAGNÓSTICO. In: XX Congreso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010. p. 225-225.

SINNOTT, Francine; LEAL, Fernanda M. A.; MESQUITA, João Paulo; HARTWIG, Daiane; BROD, Claudiomar Soares; SEIXAS, Fabiana Kommling; BRIHUEGA, Bibiana; DELLAGOSTIN, Odir; SAMARTINO, Luis; HARTLEBEN, Cláudia Pinho. EVALUTION OF A DOT-BLOT ASSAY TO IDENTIFY SEROLOGIC RESPONSES OF CATTLE INFECTED WITH *Leptospira* spp.. In: XII Congreso Argentino de Microbiologia, 2010, Buenos Aires. XII Congreso Argentino de Microbiologia, 2010.

LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos; FONSECA, Gabriela de Magalhães da; BANDEIRA, Luísa de Souza; LUZ, Viviane Kopp da; MAIA, Luciano Carlos da; OLIVEIRA, Antônio Costa de. Tolerância de genótipos de arroz irrigado ao frio no período de germinação. In: XVIII CIC da UFPel - Congresso de Iniciação Científica, 2009, Pelotas - RS. XVIII CIC, XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. Pelotas - RS: Universidade Federal de Pelotas, 2009.