

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Gabriela Merker Breyer

**Identificação de sequências promotoras e terminadoras preditas no genoma de
Mycoplasma hyopneumoniae e sua influência na transcrição gênica**

Porto Alegre

2016

Gabriela Merker Breyer

**Identificação de sequências promotoras e terminadoras preditas no genoma de
Mycoplasma hyopneumoniae e sua influência na transcrição gênica**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora Prof.^a Dr.^a Irene Silveira Schrank

Co-orientadora Dr.^a Franciele Maboni Siqueira

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

A todos meus familiares, principalmente meus pais, Rogério e Fabiana, por sempre me incentivarem e me encorajarem a seguir os meus sonhos. Obrigada por se orgulharem de cada pequena conquista.

Ao meu namorado, Eduardo, pela paciência e apoio constantes. Obrigada por tornar minha vida mais leve e mais feliz.

À minha orientadora, Irene, pela orientação, dedicação e ajuda nos projetos desenvolvidos no laboratório.

À minha co-orientadora, Fran, pela amizade e por sempre estar disposta a conversar e ajudar. Obrigada por confiar e incentivar meu trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pelo auxílio e companheirismo diário. Obrigada pelos ensinamentos, conversas, cafés e por contribuírem para minha formação.

Aos meus colegas de curso, que se tornaram grandes amigos. Estes quatro anos só foram possíveis pelo companheirismo de vocês. Sempre lembrarei de nossos estudos, gargalhadas, conversas de corredor, agonias antes de provas e de nossas sextas, é claro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade, e ao apoio financeiro do CNPq e CAPES.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Gênero <i>Mycoplasma</i>	1
1.2 A espécie <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	2
1.3 Organização gênica em <i>M. hyopneumoniae</i>	3
1.4 Elementos promotores da transcrição gênica.....	3
1.5 Elementos terminadores da transcrição gênica	4
1.6 Estudos transcricionais em <i>M. hyopneumoniae</i>	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. METODOLOGIA.....	9
3.1 Análise <i>in silico</i>	9
3.2 Projeção de <i>primers</i>	10
3.3 Linhagem bacteriana e condições e cultivo	12
3.4 Extração e quantificação de RNA de <i>M. hyopneumoniae</i>	13
3.5 Síntese de cDNA e confirmação por PCR	14
3.6 PCR quantitativo.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Refinamento das predições de promotores e terminadores.....	16
4.2 Classificação das Unidades Transcricionais	16

4.3	Isolamento de RNA.....	17
4.4	Síntese de cDNA.....	18
4.5	Confirmação da indução das condições de cultivo em estresse.....	19
4.6	Perfil transcricional da UT 62.....	21
4.7	Perfil transcricional de UT 7.....	22
4.8	Perfil transcricional de UT 67.....	23
4.9	Perfil transcricional da UT 91.....	24
4.10	Perfil transcricional dos genes codificadores para adesinas.....	27
5.	CONCLUSÃO.....	30
6.	PERSPECTIVAS.....	31
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
Δ	letra grega <i>delta</i>
μg	micrograma
μL	microlitro
σ	letra grega <i>sigma</i>
ρ	letra grega <i>rho</i>
A	adenina
C	citossina
C	condição controle
cDNA	DNA complementar
CT	condição de estresse térmico (choque térmico)
DEPC	dicarbonato de dietila
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EF-TU	fator de alongação TU (do inglês <i>elongation factor</i>)
EO	condição de estresse oxidativo
G	guanina
h	hora
kb	quilobase
Mb	megabases
mC	unidade monocistrônica
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MMLV-RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
NRTC	controle sem transcriptase reversa (do inglês <i>no reverse transcriptase control</i>)
nt	nucleotídeo
NTC	controle sem molde (do inglês <i>no template control</i>)

ORF	fase aberta de leitura (do inglês <i>open reading frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potencial de hidrogênio
pmol	picomol
qPCR	PCR quantitativo
RACE	<i>rapid amplification of cDNAs ends</i>
rho	letra grega <i>rho</i>
RNA	ácido ribonucleico
RT	reação de transcrição reversa (do inglês <i>reverse transcription</i>)
s	segundo
T	timina
T _m	temperatura de Melting
tRNA	RNA transportador
ts	valor de limiar (do inglês <i>threshold score</i>)
TSS	sítio de início de transcrição (do inglês <i>transcriptional start site</i>)
UT	unidade transcricional ou unidade polიცистrônica
U	unidade

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Parâmetros para refinamento dos dados de promotores e terminadores.
- Figura 2. Tipos de organização gênica em *M. hyopneumoniae* 7448.
- Figura 3. Qualidade do RNA e tratamento com DNase I.
- Figura 4. Confirmação da síntese de cDNA.
- Figura 5. Expressão relativa dos genes confirmatórios da condição de estresse térmico.
- Figura 6. Expressão relativa dos genes confirmatórios da condição de estresse oxidativo.
- Figura 7. Unidade transcricional 62 de *M. hyopneumoniae* 7448.
- Figura 8. Expressão relativa dos genes da UT 62.
- Figura 9. Unidade transcricional 7 de *M. hyopneumoniae* 7448.
- Figura 10. Expressão relativa dos genes da UT 7.
- Figura 11. Unidade transcricional 67 de *M. hyopneumoniae* 7448.
- Figura 12. Expressão relativa dos genes da UT 67.
- Figura 13. Unidade transcricional 91 de *M. hyopneumoniae* 7448.
- Figura 14. Expressão relativa dos genes da UT 91.
- Figura 15. Representação da organização e expressão dos genes que codificam adesinas.
- Figura 16. Unidade transcricional 28 de *M. hyopneumoniae* 7448.
- Figura 17. Expressão relativa dos genes da UT 28.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Lista de *primers* para os genes alvos.
- Tabela 2. Lista de *primers* controles para a confirmação das condições de cultivo.
- Tabela 3. Classificação das organizações das unidades transcricionais.

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é uma bactéria caracterizada pela ausência de parede celular e genoma de tamanho diminuto. Nosso grupo tem como principal objetivo a compreensão da regulação gênica de *M. hyopneumoniae*, tendo sido realizados diversos estudos abordando este tema, que determinaram a organização genômica deste organismo em unidades transcricionais (UTs), bem como predisseram sequências promotoras e terminadoras transcricionais. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência destes elementos reguladores preditos na transcrição gênica de *M. hyopneumoniae* em diferentes condições de cultivo. Portanto, foram selecionados como alvo genes que apresentaram maior representatividade na condição controle de cultivo, ou que são regulados nas condições de estresse térmico ou oxidativo. Para confirmar a indução das condições de estresse foram selecionados alvos específicos com base na literatura existente. Primeiramente, foram realizadas análises *in silico* para o refinamento dos dados de localização de promotores e terminadores, e para a classificação das UTs de acordo com a presença destes elementos. Os cultivos de *M. hyopneumoniae* 7448 foram realizados em meio Friis nas condições de cultivo controle, estresse térmico e estresse oxidativo. A partir do RNA extraído foram sintetizados os cDNAs através de reações de Transcrição Reversa (RT), para cada condição. Os níveis de transcritos foram verificados através de PCR quantitativo (qPCR), e o cálculo de expressão relativa foi realizado pelo método $2^{-\Delta CT}$ corrigido pelo valor de eficiência dos *primers*, sendo os resultados de expressão relativa analisados estatisticamente. Na análise *in silico* foi possível determinar treze possíveis organizações das UTs de *M. hyopneumoniae*, considerando a presença ou ausência de sequências promotoras e terminadoras preditas. Através da metodologia de RT-qPCR foi possível confirmar a indução das condições de estresse e determinar o perfil de expressão dos genes alvo nas três condições de cultivo testadas. Estas informações, em conjunto com as predições de elementos reguladores, permitem inferir a influência de promotores e terminadores na transcrição dos genes alvo. A regulação da expressão gênica é um processo complexo que pode ocorrer de diversas maneiras, portanto os resultados obtidos neste trabalho servem para agregar conhecimento ao tema de regulação da transcrição em *M. hyopneumoniae*.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is a bacterium mainly characterized by lack of cell wall and reduced genome. Our group aims to elucidate the regulation of gene expression in *M. hyopneumoniae*. Previous studies had been done and were able to determinate the genomic organization of this organism in polycistronic units, named Transcriptional Units (TUs), and had predicted sequences of promoters and terminators. This study aims to evaluate the influence of these regulators elements on *M. hyopneumoniae*'s transcription at different culture conditions. Target genes were selected based on high representability on transcriptome data at standard condition, or up or down regulation at heat shock or oxidative conditions. To confirm the induction of the stress conditions, target genes were selected based on current literature. Initially, *in silico* promoter and terminator localization data refinement was performed and the polycistronic units were classified based on the presence or absence of these regulators elements. Following this analysis, *M. hyopneumoniae* 7448 was cultured in Friis broth at standard, heat shock and oxidative culture conditions. Reverse transcription reactions were performed with RNA from each condition. The relative expression data for the target genes were determinate by quantitative PCR (qPCR), and calculated by $2^{-\Delta CT}$ method revised to primers efficiency value. The relative expression data was analyzed statistically. The *in silico* approach demonstrated thirteen putative polycistronic unit organizations in *M. hyopneumoniae* genome, considering the presence or absence of promoter or terminator predicted sequences. The results from RT-qPCR allowed the confirmation of stress induction and determinate the target genes expression pattern at three culture conditions. Taken together, the correlation of regulators elements prediction and these results allow us to suggest the influence of promoters and terminators on target genes transcription. Gene expression regulation is a complex process; therefore, the results obtained in this study increase the knowledge about transcriptional regulation in *M. hyopenumoniae*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Mycoplasma*

Mycoplasma é um gênero de bactérias, da classe Mollicutes, que compreende um grupo de mais de 200 espécies, cuja principal característica é a ausência de parede celular. São considerados os menores e mais simples organismos autorreplicativos já identificados, possuindo genomas pequenos que variam de 580 a 1350 kb, e alto conteúdo A+T, de aproximadamente 70 % (SIMIONATTO *et al.*, 2013). Similarmente ao que se encontra em outras espécies, a distribuição do conteúdo G+C é desigual, sendo que em regiões codificadoras o conteúdo A+T é inferior ao de regiões intergênicas (DYBVIK *et al.*, 1996).

Morfologicamente, por apresentarem apenas uma membrana trilaminar simples, são próximos a bactérias gram-negativas. Entretanto, filogeneticamente, são próximos a bactérias gram-positivas, compartilhando um ancestral comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF *et al.*, 2004). A evolução da classe Mollicutes teria ocorrido por degeneração ou redução do genoma de bactérias gram-positivas com alto conteúdo A+T, seguidas de perda de sequências genômicas (WOESE, 1987). Concomitante a isso, o modo de vida parasitário destas bactérias permitiu a compactação de seu genoma (RAZIN, 1999).

Devido ao tamanho reduzido de seus genomas, a capacidade metabólica destes organismos é baixa, podendo ser relacionada à ausência de alguns genes e rotas metabólicas. Portanto, o crescimento das bactérias deste gênero é amplamente dependente de fatores do meio, o que limita o metabolismo destes organismos (THACKER *et al.*, 2010). Também devido a seu tamanho reduzido, as colônias de algumas espécies, como *Mycoplasma hyopneumoniae*, podem ser visualizadas apenas através de microscopia eletrônica e, geralmente, sua proliferação não leva à turbidez do meio de cultivo.

Muitos micoplasmas fazem parte da microbiota normal do hospedeiro, sendo alguns patogênicos. Comumente, os micoplasmas patogênicos não causam doenças graves, mas sim de curso crônico que podem ser agravadas através de infecções oportunistas por outros patógenos. Embora geralmente sejam bactérias extracelulares que se aderem à superfície de células e tecidos do hospedeiro, já foram descritas algumas espécies ocupando o interior de células eucarióticas (BASEMAN *et al.*, 1995).

As características peculiares dos micoplasmas citadas anteriormente fazem destes organismos bons modelos para determinação do conjunto de genes necessários para a definição de uma célula mínima (LLUCH-SENAR *et al.*, 2015).

1.2 A espécie *Mycoplasma hyopneumoniae*

A espécie *M. hyopneumoniae* está associada a suínos, sendo conhecida por ser o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína. Esta doença afeta o trato respiratório de suínos, sendo caracterizada por altas taxas de morbidade e baixas taxas de mortalidade, gerando significativas perdas econômicas na área da suinocultura, devido ao aumento do uso de medicações e diminuição do desempenho animal. Infecções por *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes em suínos em grande parte das áreas de produção em todo mundo, estando presente em 38-100 % dos animais (MAES *et al.*, 2008; SIMIONATTO *et al.*, 2013). A transmissão desta bactéria pode ser tanto horizontal, quando suínos infectados transmitem para animais sadios em virtude do compartilhamento do habitat, quanto vertical, quando a fêmea infectada transmite para sua prole (NATHUES *et al.*, 2013).

A infecção por *M. hyopneumoniae* inicia com a sua aderência ao epitélio ciliado respiratório do animal, causando inicialmente ciliostase, seguida da destruição dos cílios e podendo causar morte de células epiteliais (DEBEY *et al.*, 1994). Este processo desencadeia um processo inflamatório e supressão das respostas imunológicas inatas e adaptativas, o que torna o animal infectado mais suscetível a infecções secundárias, agravando o caso (THACKER *et al.*, 2010).

Até o momento, seis linhagens de *M. hyopneumoniae* tiveram seus genomas completamente sequenciados: as patogênicas, 7448, 232, 7422, 168 e 168-L, e a não-patogênica, J (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELLOS *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013). O tamanho do genoma destas linhagens varia de 0,89 a 0,93 Mb, com conteúdo G+C de aproximadamente 28 %.

A linhagem de *M. hyopneumoniae* 7448 foi utilizada em diversos trabalhos por nosso grupo, com o objetivo de melhor caracterizar seu genoma e sua organização gênica. O genoma desta linhagem contém 920.079 pb com 678 genes codificadores de proteínas, dos quais 417 têm função conhecida, de tal forma que cerca de 40 % dos genes preditos em *M. hyopneumoniae* 7448 correspondem a proteínas hipotéticas (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

1.3 Organização gênica em *M. hyopneumoniae*

Unidades Transcricionais (UTs) ou *clusters* gênicos são organizações genômicas onde os genes estão distribuídos em tandem ao longo do genoma, sendo geralmente delimitados por um promotor à montante e um terminador à jusante, e cuja transcrição ocorre de forma policistrônica. Análises de transcritos de genes organizados desta maneira auxiliam na elucidação de mecanismos transcricionais de controle e regulação gênica.

Estudos de determinação da organização gênica demonstraram que o genoma de *M. hyopneumoniae* está organizado preferencialmente em unidades transcricionais (SIQUEIRA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2014B). Acredita-se que o reduzido número de genes em micoplasmas e a organização dos mesmos em unidades transcricionais sejam resultado da minimização dos genomas destes organismos. Isto também resulta na transcrição de grande parte das regiões intergênicas do genoma deste organismo (SIQUEIRA *et al.* 2014B; GARDNER *et al.*, 2010).

Na linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* foi determinado que os genes deste organismo estão organizados em 121 unidades policistrônicas e em 41 unidades monocistrônicas (mCs), de acordo com uma anotação manual posteriormente confirmada por RT-qPCR de alvos específicos (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Estas unidades abrigam cerca de 95 % das *open reading frames* (ORFs) previstas para este organismo, indicando uma alta densidade gênica dentro destas unidades. Além disso, a maioria das unidades policistrônicas contém duas ou três ORFs, sendo que raramente o número de ORFs é maior que oito (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

1.4 Elementos promotores da transcrição gênica

Promotores são elementos essenciais para o início da transcrição gênica, pois determinam a sequência específica no DNA onde o complexo de início da transcrição deve ser formado, sendo importantes para a regulação desta etapa. Em procariotos, os promotores são as sequências de DNA em que a RNA polimerase e o fator sigma (σ) (holoenzima) irão se ligar para dar início à transcrição. A especificidade desta ligação ao promotor depende da variedade de fatores σ existentes na célula. A ligação da RNA polimerase às sequências promotoras pode ter sua atividade alterada, devido à interação com outras proteínas, como

ativadores e repressores, levando à regulação dos níveis de expressão gênica em determinadas condições.

Em *Escherichia coli* os primeiros estudos sobre promotores foram realizados através de experimentos de mutação destas sequências. No caso de micoplasmas existem poucos estudos na literatura sobre a identificação de sequências promotoras. Um dos estudos fundamentais abordando este tema identificou promotores putativos no genoma de *M. pneumoniae*, através de análises empregando matrizes de $\sigma 70$ de *E. coli* (WEINER *et al.*, 2000). Os promotores preditos neste estudo serviram como modelos para a construção de matrizes para diferentes espécies de micoplasmas, tornando a busca por estas sequências mais específica. No entanto, não foram utilizados para um mapeamento completo do genoma nestas espécies.

Nosso grupo desenvolveu um projeto para a identificação de sequências promotoras em *M. hyopneumoniae* 7448 (WEBER *et al.* 2012). Experimentalmente, 23 sítios de início de transcrição (*transcriptional start sites* – TSS) foram analisados através da técnica de 5' RLM-RACE e suas regiões 5' foram alinhadas para a determinação de sequências consenso. Através deste trabalho foi possível identificar uma sequência padrão, similar à região -10 dos promotores de *E. coli*. Com base neste resultado, foi construída uma matriz específica para *M. hyopneumoniae* 7448 que permitiu a predição de sequências promotoras no seu genoma, que posteriormente foram parcialmente validadas através de RT-qPCR em alvos específicos (SIQUEIRA *et al.*, 2014A). Foi observado que alguns dos promotores preditos estão localizados em regiões intergênicas dentro das unidades transcricionais deste organismo, sugerindo a existência de promotores internos às unidades policistrônicas.

1.5 Elementos terminadores da transcrição gênica

O término da transcrição é uma etapa muito importante para que a expressão gênica seja regulada corretamente. Em procariotos, os sinais de término da transcrição podem ocorrer de duas formas distintas: terminadores fator-independentes e terminadores fator-dependentes.

Os terminadores fator-dependentes requerem a atuação do fator Rho (ρ), uma helicase. Neste processo, o fator Rho se liga ao RNA e pausa o complexo de alongamento em sítios de terminação. A atuação de fator Rho é complexa, dificultando a predição de terminadores fator-dependentes baseado somente na sequência nucleotídica do genoma do organismo.

Os terminadores fator-independentes, ou intrínsecos, resultam na dissociação do complexo de alongamento da transcrição causada por interações do RNA com a RNA polimerase, sem a necessidade de proteínas auxiliares. Em *E. coli*, estes terminadores são caracterizados por sequências de DNA palindrômicas ricas em guaninas e citosinas, seguida por uma cauda de timinas (CARAFA *et al.*, 1990). No RNA, estas sequências formam estruturas secundárias, em forma de grampo, através da ligação de bases complementares, seguidas de uma cauda de uracilas. Este grampo desestabiliza o complexo de alongamento da transcrição causando a terminação.

Em micoplasmas, a ausência do gene *rho* indica que a terminação fator-dependente não ocorra nestes organismos (MITRA *et al.*, 2009). O genoma rico em A+T de bactérias deste gênero dificultam a determinação de terminadores fator-independentes através do cálculo de energia livre, uma vez que as estruturas secundárias formadas no RNA irão possuir altos valores de energia livre em decorrência das ligações fracas entre uridinas e adeninas. Entretanto com o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática passou a ser possível a detecção de terminadores intrínsecos em genomas com baixo conteúdo G+C. Através destas ferramentas, foi determinado que a terminação fator-independente apresenta o principal mecanismo de terminação em Mollicutes (HOON *et al.*, 2005).

Recentemente, predições de terminadores intrínsecos foram realizadas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 (FRITSCH *et al.*, 2015). Para isso, foram utilizados três *softwares* com diferentes estratégias de predição: TransTermHP (KINGFORD *et al.*, 2007), WebGesTer (MITRA *et al.*, 2011) e ARNold (NAVILLE *et al.*, 2011). A validação parcial dos terminadores preditos por estes programas foi realizada através da técnica de RT-qPCR em alvos específicos, e permitiu a confirmação dos terminadores preditos. Os resultados *in silico* deste trabalho demonstraram a presença de terminadores intrínsecos em 74 % das unidades policistrônicas e 82 % monocistrônicas, sendo também observado a presença de predições de sequências terminadoras em regiões intergênicas internas às UTs de *M. hyopneumoniae* 7448, sugerindo a existência de terminadores internos às unidades.

1.6 Estudos transcricionais em *M. hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae tem sido muito estudado no âmbito de análises transcritômicas. Tais análises são informativas para a determinação dos níveis de expressão de mRNA dos

genes deste organismo em diferentes condições de cultivo, possibilitando melhor compreender a estrutura do genoma e os mecanismos de infecção do mesmo.

Análises do transcrito de *M. hyopneumoniae* 7448 na condição de cultivo controle (meio Friis líquido a 37 °C por 24 h) permitiram a determinação de um perfil de expressão gênica, identificando os genes com maior representatividade de transcritos na amostra (SIQUEIRA *et al.*, 2014B). Dentre estes genes, se destacam genes associados ao metabolismo basal, chaperonas, adesinas, proteínas de superfície e transportadores. Considerando os processos de patogenicidade, a determinação de altos níveis de transcritos de adesinas e proteínas de superfície é importante, uma vez que estão potencialmente relacionados à capacidade de *M. hyopneumoniae* se ligar aos cílios do epitélio do trato respiratório do hospedeiro (WILTON *et al.*, 2009; TACCHI *et al.*, 2014).

Também foram realizadas análises do transcrito de *M. hyopneumoniae* em condições de cultivo atípicas através de microarranjo, permitindo a determinação do perfil de transcrição dos genes deste organismo em condições de estresse para a célula. Na condição de estresse térmico foi demonstrado que os genes regulados positivamente estão relacionados ao metabolismo e enovelamento de proteínas. Os genes regulados negativamente nesta condição estão associados à tradução e replicação de DNA, indicando que mudanças na temperatura tornam a fisiologia celular mais lenta (MADSEN *et al.*, 2006B). Na condição de estresse oxidativo, os genes que apresentaram regulação positiva estão associados à síntese de tRNAs e regulação, sugerindo que esta condição leva a um aumento na síntese proteica. Os genes regulados negativamente nesta condição estão associados à replicação de DNA e, paradoxalmente, na montagem do ribossomo para conservação de energia da célula, e processamento proteico, sugerindo que estes processos ocorrem mais lentamente nesta condição (SCHAFER *et al.*, 2007). Após exposição à norepinefrina, foi determinado que os genes regulados positivamente estão associados a transcrição, tradução e reparo de DNA, e os genes regulados negativamente estão relacionados principalmente a rotas metabólicas (ONEAL *et al.*, 2008). O perfil de transcrição gênica de *M. hyopneumoniae* durante infecção revelou que os genes positivamente regulados são na sua maioria transportadores de membrana e lipoproteínas, enquanto que os genes negativamente regulados estão principalmente associados a processos de transcrição e tradução (MADSEN *et al.*, 2008). Na condição de depleção de ferro, os genes regulados positivamente estão envolvidos com o metabolismo e transporte na célula, e os genes negativamente regulados estão associados à tradução e crescimento celular (MADSEN *et al.*, 2006A).

A identificação e caracterização de sequências promotoras e terminadoras é de extrema importância para a compreensão da regulação da transcrição gênica. A existência destes elementos dentro de UTs de *M. hyopneumoniae* corrobora com a hipótese de que promotores e terminadores internos exerçam influência sobre os níveis de expressão gênica dos genes que compõem cada unidade policistônica. Esta hipótese foi parcialmente confirmada através de análises da expressão gênica de nove genes alvo, onde foi possível observar variação dos níveis de transcritos entre os genes de uma mesma UT (SIQUEIRA *et al.*, 2014A).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Localizar as sequências promotoras e terminadoras da transcrição preditas *in silico*, considerando a organização gênica, no genoma de *M. hyopneumoniae*, e determinar a possível influência destes elementos sobre a expressão gênica de alvos específicos em diferentes condições de cultivo.

2.2 Objetivos específicos

- Localizar as sequências de promotores e terminadores preditas *in silico* no genoma de *M. hyopneumoniae*, em relação às UTs.
- Estabelecer o padrão de ocorrência de sequências promotoras e terminadoras nas UTs de *M. hyopneumoniae*.
- Extrair RNA de *M. hyopneumoniae* em três condições de cultivo: cultivo controle, estresse térmico e estresse oxidativo.
- Sintetizar DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, em cada uma das condições em estudo.
- Analisar o perfil de expressão gênica dos alvos selecionados, através de PCR quantitativo (qPCR) em cada uma das condições realizadas.
- Correlacionar a presença de sequências promotoras e terminadoras aos níveis transcricionais dos genes alvo.

3. METODOLOGIA

3.1 Análise *in silico*

O posicionamento das sequências promotoras e terminadoras no genoma de *M. hyopneumoniae* foi realizado com base nos dados obtidos em trabalhos anteriores realizados no laboratório (WEBER *et al.*, 2012; FRITSCH *et al.*, 2015). Esta etapa da análise *in silico* foi realizada com base na anotação mais recente disponibilizada no NCBI do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 (NC_007332.1), empregando o programa de visualização de genomas Artemis Release 16.0.0.

Os dados referentes às sequências promotoras provêm de uma matriz específica para *M. hyopneumoniae* 7448 construída pelo nosso grupo (WEBER *et al.*, 2012). Esta matriz analisou todo genoma deste organismo, desconsiderando o posicionamento dos genes anotados, e classificou as sequências preditas de acordo com o *threshold score* (ts), como promotores fortes ($ts \leq 6.5$) e fracos ($4.2 \leq ts < 6.5$). Foram preditas 2717 sequências, sendo 2115 promotores fracos e 602 promotores fortes (WEBER *et al.*, 2012).

Os dados referentes às sequências terminadoras foram obtidos através dos *softwares* de predição de terminadores Rho-independentes ARNold, TransTermHP e WebGesTer (FRITSCH *et al.*, 2015). Os programas Arnold e TransTermHP procuram por sequências palíndromes em todo o genoma, desconsiderando o posicionamento dos genes. Enquanto que o programa WebGesTer permite o estabelecimento de parâmetros na análise destes elementos, possibilitando determinar o número de nucleotídeos à montante e à jusante do último nucleotídeo de cada gene em que a procura deve ser realizada; os parâmetros utilizados neste caso foram 20 nucleotídeos à montante e 270 nt à jusante do último nucleotídeo de cada gene. Como a predição do *software* WebGesTer leva em conta a posição do último nucleotídeo de cada gene, uma nova busca foi realizada empregando a anotação mais recente do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, diferentemente da empregada na predição anterior (FRITSCH *et al.*, 2015). Para esta análise foram utilizados os mesmos parâmetros de FRITSCH *et al.*, sendo 20 nt à montante e 270 nt à jusante do códon de parada de cada gene. As predições dos outros dois programas foram mantidas as mesmas realizadas anteriormente (FRITSCH *et al.*, 2015). Estas análises resultaram na predição de 1001 sequências terminadoras, sendo 439 obtidas através do *software* ARNold, 334 do *software* TransTermHP, e 228 do *software* WebGesTer (FRITSCH *et al.*, 2015).

Neste trabalho, os parâmetros utilizados para o posicionamento de sequências promotoras foram 350 nt à montante e 50 nt à jusante do primeiro nucleotídeo do códon iniciador do gene que inicia cada unidade. Para os promotores internos às UTs, os parâmetros utilizados foram 60 nt à montante e 20 nt à jusante do primeiro nucleotídeo do códon iniciador de cada gene. Os parâmetros utilizados para o posicionamento de sequências terminadoras foram: 20 nt à montante e 270 nt à jusante do último nucleotídeo do códon de parada de cada gene. As representações dos parâmetros utilizados para o refinamento podem ser visualizadas na Figura 1.

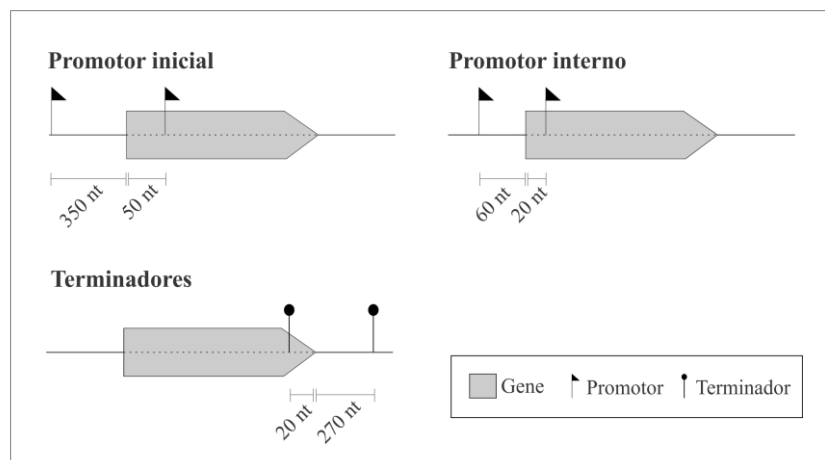


Figura 1. Parâmetros para refinamento dos dados de promotores e terminadores. Representação dos parâmetros utilizados para o refinamento das previsões anteriores de sequências promotoras e terminadoras em *M. hyopneumoniae*, considerando a organização do genoma em unidades transcricionais. Em cinza estão representadas as ORFs sendo suas extremidades definidas pelo códon iniciador e terminador.

3.2 Projeção de *primers*

Para analisar os níveis de expressão gênica em diferentes condições de cultivo, genes alvo foram selecionados, levando em consideração resultados anteriores de expressão gênica, como: nível de expressão com maior representatividade na condição de cultivo controle, com base nos dados obtidos na análise do transcrito de *M. hyopneumoniae* 7448 (SIQUEIRA *et al.*, 2014B); ou que são regulados positiva ou negativamente nas condições anteriormente estudadas de estresse oxidativo (SCHAFER *et al.*, 2007) e estresse térmico (MADSEN *et al.*, 2006B). Em alguns casos também foram desenhados *primers* para os genes que compartilham a UT com os alvos citados acima, permitindo uma análise comparativa dos níveis de transcrição da unidade completa ou parcial. A lista de *primers* utilizados pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de *primers* para os genes alvos.

UT*	Gene	Primer	Sequência (5'-3')	T _m (°C)	Fragmento (pb)	Eficiência **
7	<i>dnaJ</i>	dnaJ_F	GTCGAGGTTCCCAGCCCAACC	62.7	173	1,953
		dnaJ_R	TGACGGGGACTAAATTCGGGG	59.1		
7	<i>dnaK</i>	dnaK_F	CTGCTCCACGAGGTCTTCCCC	62.0	181	1,868
		dnaK_R	TCACGATTTTCTTCGGCTTCCTG	57.5		
28	MHP7448_197	197 F	TCGGAGAAAATTACAAAAACGCTC	54.1	168	1,553
		197 R	CTAAGAACGCTGCTAAGGGCAG	57.9		
28	MHP7448_198	198 F	GCCCAGATGAAGTTCAGCCAG	58.3	159	1,836
		198 R	CATAGGCAGAAAGATTTTGACCC	54.0		
28	MHP7448_199	199 F	GCCGATAGAAAAGGAAAAGGAC	53.8	169	1,827
		199 R	CACGTTTTGGGTACTTTGTGG	54.8		
62	<i>glpF</i>	glpF F	GATCCTAGTGAAAAGTCCAAGTG	60.8	174	1,889
		glpF R	CTGCCATCATAACAAGCCCTG	62.4		
62	<i>glpK</i>	glpK F	GCGTACTGGATTGGATTATTTTC	58.9	161	1,888
		glpK R	GCCTTATTTGGTCAACTTGC	58.4		
67	MHP7448_391	391 F	CGAAATGAACTTGAAGGCGAC	54.5	176	1,827
		391 R	GCGGAAACTTTGACTGTATTCCC	56.3		
67	MHP7448_392	392 F	GATGCCTTAGATCAAACAAGACC	53.7	167	1,789
		393 R	GGATCATCAATCTGCGGAGATG	55.5		
67	<i>ftsZ</i>	393 F	CGTTACCTCAGCAATCGCTAAGG	57.7	161	1,479
		393 R	GAATATCGCTAATTTGCGGCTTGC	54.7		
86	MHP7448_496	496 F	CAAGACTGAAGGCTTGTTTTCC	54.4	175	1,913
		496 R	CCCCGACAAAACGTATATTACCG	55.6		
89	MHP7448_513	513 F	CCTGAAAATGGAAGTGGAGTTGG	56.1	176	1,848
		513 R	CCTAATAGACCCGCAGCAAGTG	57.7		
91	<i>tufA</i>	tuf F	CTGTTCGGGAAATGGATAAAC	51.5	168	1,832
		tuf R	GATTACGGTCTTTTTAGGTCTTC	51.7		
91	<i>lon</i>	lon F	TAAAACCTCAAGCATCGCCG	58.4	165	1,835
		lon R	GAAATCCGAGGACATCGCC	62.3		
91	MHP7448_525	525 F	CCAAAAATGATTCCAGGGAA	56.3	190	1,857
		525 R	GGCGTTTTAATTACACCGG	58.0		
91	<i>upp</i>	upp F	GGCTCTAAAACAATCGCAACTG	60.8	153	1,883
		upp R	CGGTTTGGGTATGCTTGACTC	62.6		
91	<i>deoC</i>	deoC F	GCTTTGATTGCCAATTTTTCG	56.7	163	1,861
		deoC R	CAGCCCTTTTATCACCTCATG	60.6		
116	MHP7448_656	656 F	GGCAATTTCTGGGACAACAACAG	57.0	176	1,835
		656 R	CGACTAAACCAGGATAGGAATCC	54.6		

* A unidade transcricional (UT) está indicada de acordo com a anotação do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448.

** A eficiência dos *primers* foi calculada pelo *software* LinRegPCR com base nos resultados de qPCR.

Para o controle das condições de cultivo analisadas, foram projetados *primers* para genes anteriormente apontados como responsivos – positiva ou negativamente – às condições analisadas. As informações sobre estes *primers* controles são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de *primers* controles para a confirmação das condições de cultivo.

Regulação*	Gene	Primer	Sequência (5'-3')	T _m (°C)	Fragmento (pb)	Eficiência**
↑ EO	<i>atpB</i>	atpB F	TCAGGCGTCCAGTGAATCTATC	56.3	186	1,878
		atpB R	TGCTTCATCCTGATTTACCTCC	54.5		
↑ EO	<i>glyS</i>	glyS F	GGGTGGGGTGAATTGATTGG	56.3	165	1,865
		glyS R	CGCCAACATTAAACGATCAAGG	54.7		
↑ EO	<i>mglA</i>	mglA F	CAACCGCAAGTTTTTCATCCTCG	56.9	158	1,878
		mglA R	ACCCGATCAGCGATTCCGATAAC	58.9		
↓ EO	<i>ftsY</i>	ftsY F	GTCAAAATGGGGTTTCGCAGG	57.1	165	1,937
		ftsY R	CATCCATCGCTTCGCCAAGTC	58.7		
↑ CT	<i>dnaK</i>	dnaK F	CTGCTCCACGAGGTCTTCCCC	62.0	181	1,868
		dnaK R	TCACGATTTTCTTCGGCTTCCTG	57.5		
↑ CT	<i>dnaJ</i>	dnaJ F	GTCGAGGTTCCAGCCCAACC	62.7	173	1,953
		dnaJ R	TGACGGGGACTAAATTCGGGG	59.1		
↑ CT	<i>oppC</i>	oppC F	CCGATTTACAAAGCCGATCCTG	58.4	178	1,861
		oppC R	GAATCTGCCAGCGATTTGGG	56.7		
↑ CT	<i>glpK</i>	glpK F	GCAGGCAGCAAAAACAAAGGCG	60.6	158	1,888
		glpK R	CACAAAAATCACTCGTGCGGCG	59.6		
↑ CT	<i>glpF</i>	glpF F	GATCCTAGTGAAAGTCCAAGTG	60.8	174	1,889
		glpF R	CTGCCATCATAACAAGCCCTG	62.4		
***	<i>pcrA</i>	pcrA F	GCATGATTTTCCCGATCTCCAG	56.0	184	1,872
		pcrA R	CTTCAGCTCCCCTTCATTGGC	58.5		
***	MHP7448_333	333 F	TGGGCAATCAAGAAGCAAC	53.6	166	1,918
		333 R	TGAAAACGGAAAACACCTTG	51.5		

* Resposta a nível transcricional do gene à condição de estresse oxidativo (EO) ou térmico (CT) quando comparado ao cultivo controle, de acordo com análises de microarranjo. As setas indicam regulação positiva (↑) ou negativa (↓).

** A eficiência dos *primers* foi calculada pelo *software* LinRegPCR com base nos resultados de qPCR.

*** Os *primers* do gene *pcrA* foram utilizados nas reações de PCR para confirmação do tratamento com DNase e da síntese de cDNA. Os *primers* do gene MHP7448_333 foram utilizados na qPCR, como gene normalizador.

Para o controle das condições de cultivo analisadas, foram projetados *primers* para genes anteriormente apontados como responsivos – positiva ou negativamente – às condições analisadas, de acordo com análises de microarranjo. As informações sobre estes *primers* controle são apresentadas na Tabela 2.

3.3 Linhagem bacteriana e condições de cultivo

Os experimentos realizados neste trabalho foram realizados com a linhagem patogênica 7448 de *M. hyopneumoniae*, isolada de um suíno que apresentava pneumonia enzoótica suína (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Os cultivos foram feitos em meio Friis líquido (FRIIS, 1975), a 37 °C por 48 h, sob leve agitação. O crescimento de *M. hyopneumoniae* é visualizado pela acidificação do meio gerada pela oxidação da glicose,

alterando o pH e ocasionando a mudança de coloração do meio Friis para amarelo, devido a presença do indicador vermelho fenol.

Os cultivos foram realizados em meio Friis líquido, em três condições diferentes: i) controle: cultivado a 37 °C por 24 h; ii) estresse térmico: cultivo igual ao controle, seguido de incubação a 30 °C por 2 h e a 42 °C por 30 min (MADSEN *et al.*, 2006B); e, iii) estresse oxidativo: cultivo igual ao controle, seguido da adição de 1 % de peróxido de hidrogênio e incubação a 37 °C por 15 min (SCHAFER *et al.*, 2007). Tais condições de cultivo induzem estresse às células de *M. hyopneumoniae*, permitindo posteriormente analisar os efeitos de cada uma destas condições atípicas.

3.4 Extração e quantificação de RNA de *M. hyopneumoniae*

Para cada condição de cultivo realizada foram feitas extrações de RNA de *M. hyopneumoniae* a partir de 30 mL de cultivo utilizando o kit Illustra™ RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo a descrição do fabricante, e ressuspendido em 100 µL de água RNase-free (DEPC). A qualidade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose 1 %. As extrações foram realizadas em duplicatas biológicas.

Os RNAs extraídos foram nomeados da seguinte forma: C1 e C2 (extrações em condição de cultivo controle); CT1 e CT2 (extrações em condição de estresse térmico); e, EO1 e EO2 (extrações em condição de estresse oxidativo). E foram quantificados através do kit de quantificação de RNA Qubit® RNA HS Assay kit (Thermo Fischer Scientific) pelo equipamento Qubit® Fluorometer.

Para eliminação de DNAs contaminantes nas amostras de RNA foi realizado um tratamento com DNase I (50 U/µL – Fermentas) em 3 µg de cada RNA, em um volume total de 30 µL de reação. Os RNAs extraídos foram tratados com 40 U da enzima, e incubados a 37 °C por 30 min, seguidos de adição de EDTA e uma incubação a 65 °C por 10 min, para inativação da enzima. Após o tratamento, a qualidade do RNA foi novamente verificada através de gel de agarose 1 %.

Posteriormente, foram realizadas reações em cadeia de polimerase (PCR) com os RNAs tratados, para confirmar a eficiência do tratamento, ou seja, a ausência de DNA

contaminante. O par de *primers* do gene *pcrA* foi utilizado nestas reações (Tabela 2). Os resultados das ampliações foram verificados em géis de agarose 1 %.

3.5 Síntese de cDNA e confirmação por PCR

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada através de reações de transcrição reversa (RT) para cada RNA extraído.

Para cada reação, com um volume final de 30 μ L, foi utilizada 500 ng de RNA total, 132,5 ng de *primer* p(dN)6 randômico e 10 mM de dNTPs, incubados a 65 °C por 5 min, e imediatamente incubado no gelo, para evitar a formação de estruturas secundárias no RNA. Posteriormente, foi adicionado 10X Tampão *First Strand*, e 0,1M de DTT, sendo incubados a 37 °C por 2 min. Por fim, exceto nas reações controle, foi adicionado 200 U da enzima MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Invitrogen) e incubadas a 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. Os controles negativos das reações de síntese foram realizados em paralelo, porém sem a adição de MMLV-RT. Os cDNAs foram diluídos 1:5 com água DEPC, totalizando 100 μ L, e armazenados a -20 °C.

Para confirmar a síntese de fita dupla foi realizada uma reação de PCR, utilizando como molde cada cDNA sintetizado. Para estas reações foram utilizados os *primers* do gene *pcrA* (Tabela 2). Os resultados foram verificados em géis de agarose 1 %.

3.6 PCR quantitativo

Os níveis de expressão dos genes alvo foram verificados através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o sistema Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix – UDG (Invitrogen).

Cada reação foi composta de 1 μ L de cDNA diluído, 10 pmol de cada *primer*, 7,5 μ L de Platinum™ SYBR™, e 1 μ L do reagente ROX (0,1 X), totalizando um volume final de 15 μ L. As condições utilizadas para amplificação foram as seguintes: uma etapa de desnaturação a 90 °C por 2 min, seguida de 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 95 °C por 15 s, e 60 °C por 1 min. O valor de corte (*threshold*) foi determinado manualmente, em uma região linear da curva de

amplificação logarítmica. A especificidade de cada par de *primers* foi analisada através de curva de *melting*.

As reações aqui descritas foram realizadas juntamente com os seguintes controles do método: reações sem cDNA (NTC) como controle da placa; e reações com os cDNAs negativos de cada uma das extrações realizadas (NRTC) como controle da RT realizada previamente.

O cálculo de expressão relativa dos mRNAs foi realizado através do método $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK *et al.*, 2001), corrigido de acordo com o valor de eficiência dos *primers*. Os valores de expressão dos genes controle das condições de estresse e dos genes alvo foram normalizados em relação ao valor de expressão do gene MHP7448_0333 (MADSEN *et al.*, 2008; MOITINHO-SILVA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2014). Para cada gene alvo foram realizadas triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. As análises estatísticas da expressão relativa dos genes alvo e da comparação dos genes de uma mesma UT foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 6, utilizando o teste *One-way ANOVA by Tukey's multi comparison* ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Refinamento das predições de promotores e terminadores

Neste trabalho, foram utilizados parâmetros mais restritivos, conforme descrito na metodologia, sob os dados obtidos nas predições de elementos promotores e terminadores realizadas anteriormente, permitindo o refinamento das predições e possibilitando a identificação dos elementos promotores e terminadores possivelmente verdadeiros em escala genômica. Além disso, este refinamento considerou a organização genômica de *M. hyopneumoniae* em UTs (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Após a aplicação destes parâmetros, o número de sequências promotoras passou para 467 sequências, sendo 248 promotores fracos e 219 promotores fortes, e o número de sequências terminadoras passou para 501 sequências, sendo 94 preditas através do *software* ARNold, 196 do *software* TransTermHP, e 211 do *software* WebGesTer.

4.2 Classificação das Unidades Transcricionais

As 121 UTs de *M. hyopneumoniae* foram analisadas quanto a sua organização genômica, e classificadas de acordo com sua organização. Foram identificados treze tipos diferentes de organizações (Tabela 3 e Figura 2).

Tabela 3. Classificação das organizações das unidades transcricionais.

Tipo	Promotor inicial	Promotor interno	Terminador interno	Terminador final	Número de UTs *	Frequência (%) **
1	x	x	x	x	39	32,2
2	x	x	x		15	12,4
3	x			x	13	10,7
4	x	x		x	11	9,1
5	x				9	7,4
6	x	x			7	5,8
7		x	x	x	6	5,0
8		x	x		5	4,1
9		x		x	5	4,1
10			x		3	2,5
11	x		x	x	3	2,5
12					3	2,5
13			x	x	2	1,7

* Número de unidades transcricionais de *M. hyopneumoniae* 7448 que apresentam esta organização. A presença de elementos reguladores está indicada por (x).

** Frequência foi calculada com base no número total de 121 unidades transcricionais.

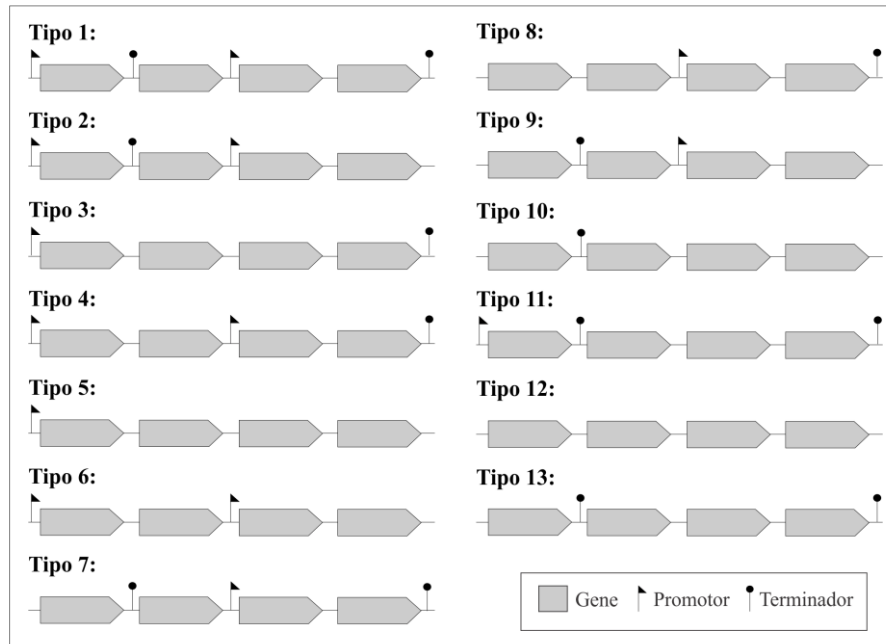


Figura 2. Tipos de organização gênica em *M. hyopneumoniae* 7448. Representação esquemática dos treze tipos de organização gênica das unidades transcripcionais em *M. hyopneumoniae*, considerando sequências promotoras e terminadoras previstas. As figuras não representam a realidade absoluta quanto ao número de genes e posições dos elementos promotores e terminadores internos. As representações de promotores e terminadores indicam a existência de pelo menos uma sequência reguladora prevista na posição indicada.

Dos 678 genes anotados de *M. hyopneumoniae* 7448, 103 possuem promotor e terminador próprios; destes, 80 estão dentro de UTs. Os genes escolhidos como alvos neste trabalho, além de estarem envolvidos em rotas de interesse, também apresentam promotores e terminadores próprios previstos.

4.3 Isolamento de RNA

A qualidade dos RNAs de *M. hyopneumoniae* extraídos em cada condição de cultivo foi verificada através de géis de agarose 1 % (Figura 3A). A quantificação das amostras de RNA determinou que as concentrações dos RNAs extraídos variaram de 120 a 380 ng/ μ L.

Após a quantificação, cada RNA foi tratado com DNase I para eliminação de DNAs contaminantes nas amostras. A qualidade dos RNAs foi novamente verificada para garantir que este tratamento não causou degradação às moléculas de RNA (Figura 3B). Além disso, para confirmar o tratamento com DNase I, os RNAs tratados foram utilizados como molde em reações de PCR. Cada amostra de RNA foi testada em uma reação juntamente com um controle positivo da reação de PCR (DNA de *M. hyopneumoniae*), e um controle negativo da reação de PCR (reação sem molde). Todos os tratamentos foram confirmados, uma vez que

não houve amplificação nas reações utilizando RNA, indicando a ausência de DNA na amostra (Figura 3C).

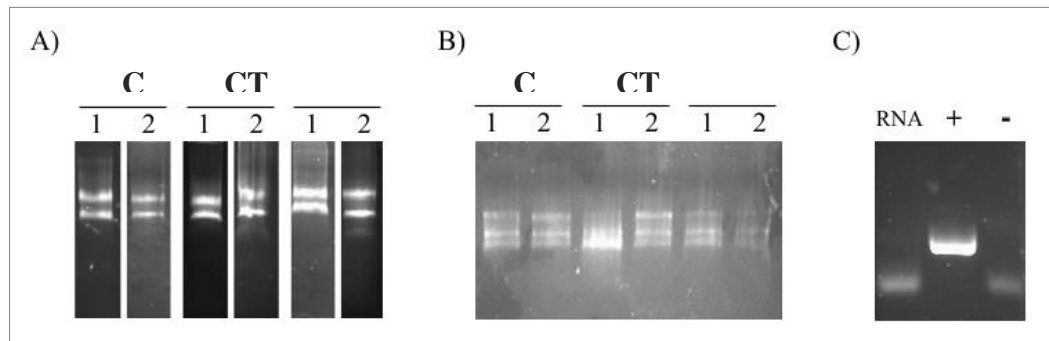


Figura 3. Qualidade do RNA e tratamento com DNase I. Verificação da qualidade dos RNAs extraídos em cada condição através de eletroforese em gel de agarose, A) antes e B) após o tratamento com DNase I. As condições de cultivo estão indicadas por: cultivo controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). Os números 1 e 2 indicam as replicatas biológicas. C) Exemplo da confirmação do tratamento com DNase I por reação de PCR, empregando os *primers* do gene *pcrA* de *M. hyopneumoniae* 7448 (banda de 184 pb). As canaletas indicam a reação com reação com RNA, o controle positivo da reação de PCR (+) e o controle negativo da reação de PCR (-).

4.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir de cada amostra de RNA tratado foi confirmada através de reações de PCR. Cada cDNA foi testado juntamente com um controle negativo da reação de RT (sem transcriptase reversa), um controle positivo da reação de PCR (DNA de *M. hyopneumoniae*) e um controle negativo da reação de PCR (reação sem molde). Todas as reações foram confirmadas (Figura 4).

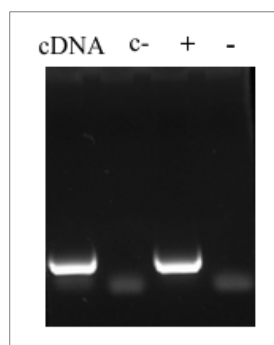


Figura 4. Confirmação da síntese de cDNA. Exemplo da confirmação da síntese de cDNA por reação de PCR, empregando os *primers* do gene *pcrA* de *M. hyopneumoniae* 7448 (banda de 184 pb). As canaletas indicam a reação com cDNA, a reação controle da reação de RT (c-), o controle positivo da reação de PCR (+) e o controle negativo da reação de PCR (-).

4.5 Confirmação da indução das condições de cultivo em estresse

Para confirmar a indução de estresse nos cultivos realizados foram selecionados genes alvo para o controle *in vitro* das condições de estresse térmico e oxidativo, baseado na literatura existente. Nove genes, apontados como diferencialmente expressos em análises de microarranjo (MADSEN *et al.*, 2006B; SCHAFER *et al.*, 2007), foram selecionados, sendo eles: cinco genes regulados positivamente na condição de estresse térmico (*glpK*, *glpF*, *dnaK*, *dnaJ* e *oppC*), e quatro genes regulados positiva (*atpB*, *glyS* e *mglA*) ou negativamente (*ftsY*) na condição de estresse oxidativo. Estes genes foram testados nas três condições de cultivo analisadas neste trabalho.

Dos genes confirmatórios da condição de estresse térmico, três (*glpK*, *glpF*, *dnaK*) tiveram sua expressão relativa elevada quando comparados ao cultivo controle ($P < 0,05$). O gene *dnaJ* não apresentou expressão diferencial nas condições analisadas. E o gene *oppC* apresentou diminuição nos níveis de expressão quando comparado ao cultivo controle ($P < 0,05$), comportamento divergente ao encontrado na literatura onde sua expressão foi elevada (MADSEN *et al.*, 2006B). Além disso, é possível observar que *oppC* apresentou expressão diferencial na condição de estresse oxidativo ($P < 0,05$), mostrando que também é regulado nesta condição e pode ser incluído como gene confirmatório da indução desta condição (Figura 5).

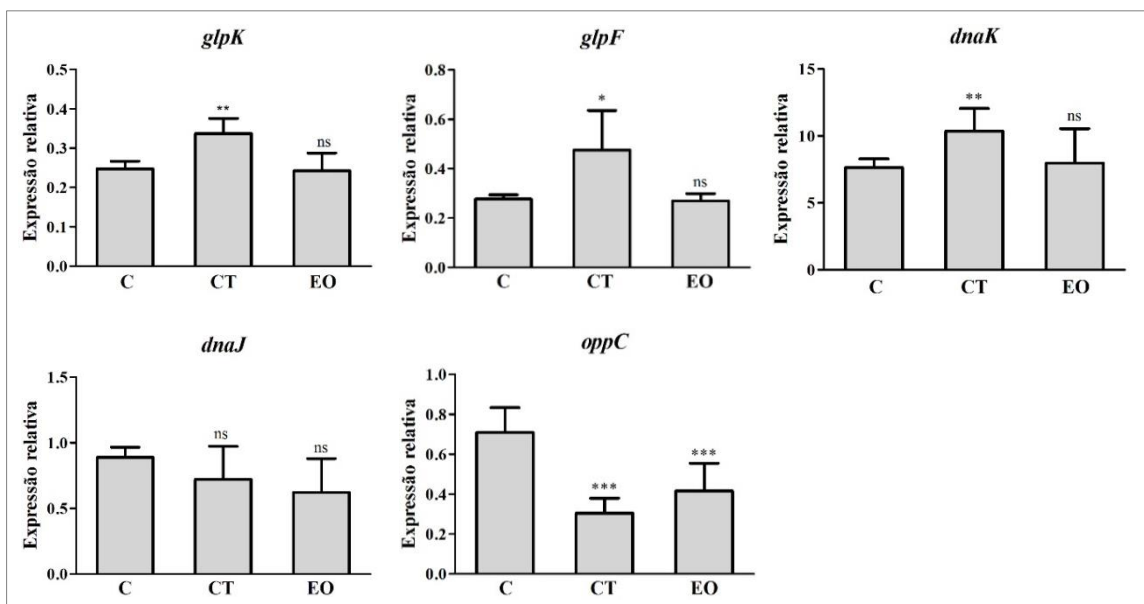


Figura 5. Expressão relativa dos genes confirmatórios da condição de estresse térmico. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

Dos genes confirmatórios da condição de estresse oxidativo, *ftsY* teve sua expressão diminuída quando comparado ao cultivo controle ($P < 0,05$), corroborando com os dados gerados pela análise de microarranjo (SCHAFER *et al.*, 2007). O gene *atpB* também apresentou diminuição no seu nível de transcrição nesta condição ($P < 0,05$), comportamento divergente ao observado na análise de microarranjo (SCHAFER *et al.*, 2007). Os genes *glyS* e *mglA* não apresentaram mudanças significativas nos seus níveis de expressão. Também é possível observar que *ftsY* tem expressão diferencial na condição de estresse térmico em relação ao cultivo controle ($P < 0,05$), demonstrando que este gene também pode ser usado na confirmação da indução desta condição (Figura 6).

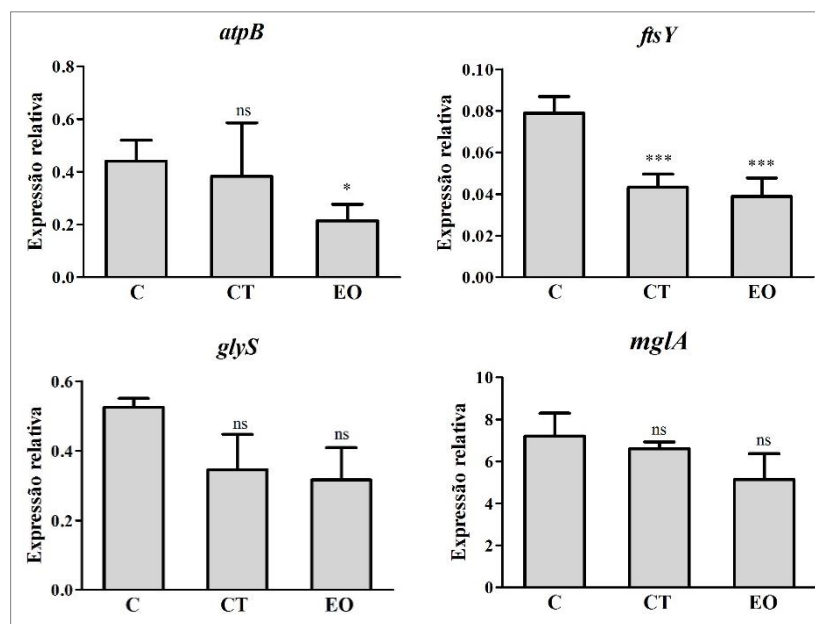


Figura 6. Expressão relativa dos genes confirmatórios da condição de estresse oxidativo. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

De modo geral, quatro dos genes testados para estresse térmico, e dois dos genes testados para estresse oxidativo apresentaram expressão diferencial nestas condições. Tais resultados confirmam a indução de estresse térmico e oxidativo nos cultivos através das metodologias empregadas.

4.6 Perfil transcricional da UT 62

A UT 62, composta pelos genes *glpK* e *glpF*, foi analisada por completo e seus resultados serviram como modelo de UT sem elementos internos, uma vez que esta unidade possui organização do tipo 5 (Figura 7A). Os resultados obtidos através de RT-qPCR mostram que a expressão relativa dos dois genes se mantém semelhantes entre si, sem apresentar mudanças significativas, o que é condizente com a ausência de elementos reguladores internos a esta unidade (Figura 7B).

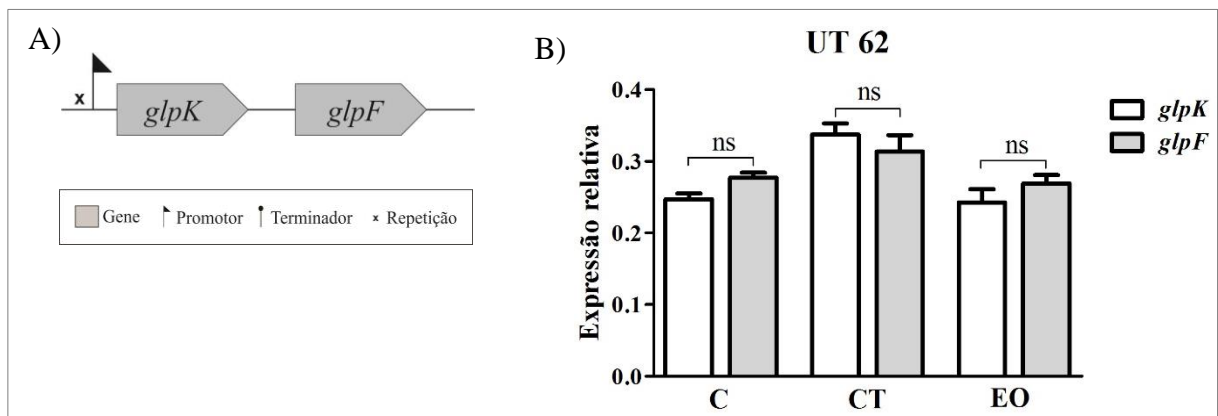


Figura 7. Unidade transcrricional 62 de *M. hyopneumoniae* 7448. A) Representação da organização genômica da unidade, e B) comparação da expressão relativa dos genes da unidade. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

Os genes *glpK* e *glpF* estão envolvidos na via metabólica da glicose e, como indicado nos gráficos de expressão relativa individual de cada gene, ambos são regulados positivamente na condição de estresse térmico quando comparados ao cultivo controle ($P < 0,05$), sugerindo uma maior atividade desta via nesta condição (Figura 8).

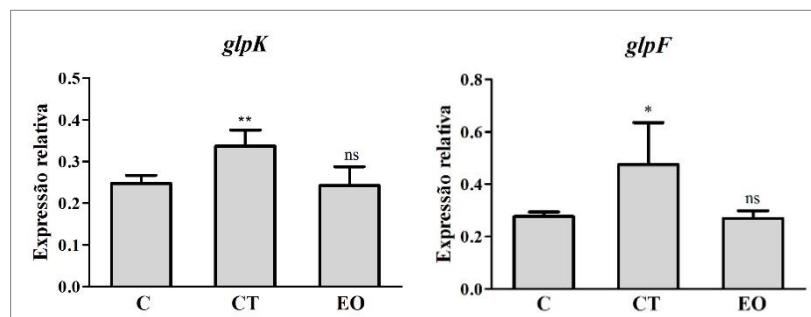


Figura 8. Expressão relativa dos genes da UT 62. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

4.7 Perfil transcricional da UT 7

A UT 7 possui organização gênica do tipo 1 e é composta por nove genes, dos quais *dnaK* e *dnaJ* foram analisados neste trabalho (Figura 9A). Estes genes codificam para chaperonas (*heat shock proteins*), tendo papel no modelamento de proteínas na célula na condição de estresse térmico. Os resultados obtidos através de RT-qPCR mostram que estes genes tiveram expressões relativas significativamente distintas, sendo *dnaK* o gene com maior índice de expressão (Figura 9B).

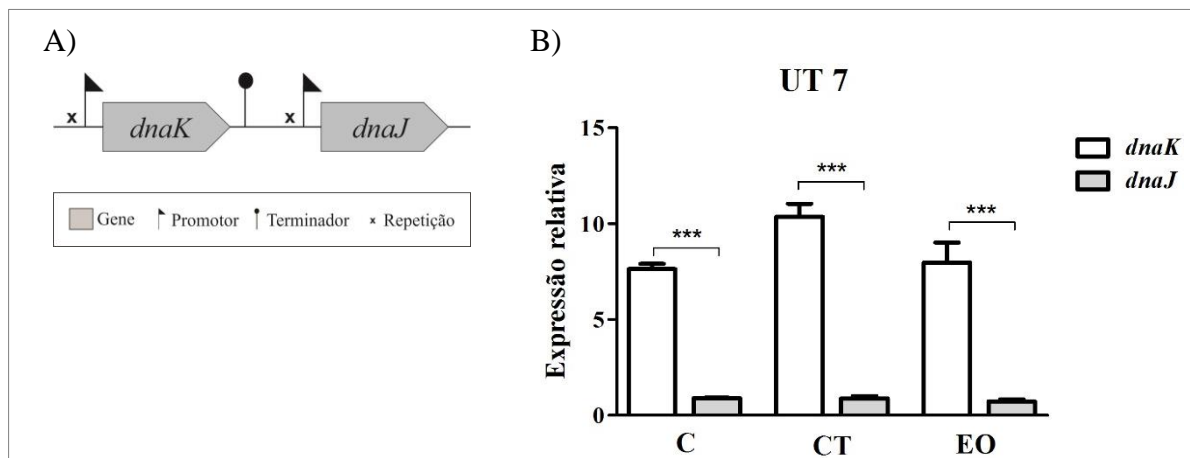


Figura 9. Unidade transcritiva 7 de *M. hyopneumoniae* 7448. A) Representação da organização genômica da unidade, e B) comparação da expressão relativa dos genes da unidade. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

Os promotores preditos para ambos os genes são classificados como fortes, o que não justifica a maior expressão de *dnaK*. Portanto, a partir deste resultado (Figura 9B) é possível inferir a possibilidade de que o terminador de *dnaK* seja ativo, o que poderia estar causando a diminuição da transcrição de *dnaJ*. Além disso, tanto *dnaK* quanto *dnaJ* apresentam elementos repetitivos preditos nas suas regiões regulatórias 5', que poderiam estar envolvidos na regulação dos níveis de transcrição destes genes (CATTANI *et al.*, 2016).

Como pode ser visto nos gráficos de expressão relativa individual, o gene *dnaK* apresentou expressão relativa elevada nas condições de estresse térmico quando comparado ao cultivo controle ($P < 0,05$), o que é coerente com o esperado, dada a sua função biológica. O gene *dnaJ* não apresentou expressão diferencial nas condições analisadas (Figura 10).

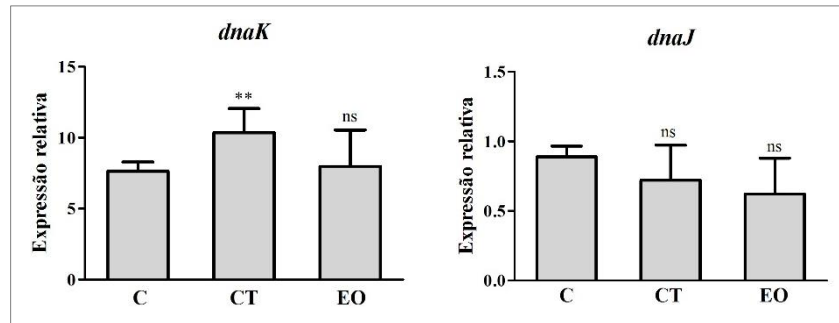


Figura 10. Expressão relativa dos genes da UT 7. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

4.8 Perfil transcricional da UT 67

A UT 67 possui organização gênica do tipo 2 e é composta por seis genes, dos quais três foram analisados, são eles MHP7448_391, MHP7448_392 e *ftsZ* (Figura 11A). Os genes MHP7448_391 e *ftsZ* estão envolvidos na divisão celular, e MHP7448_392 codifica para uma metiltransferase. Os resultados obtidos através de RT-qPCR mostram que há diferenças significativas entre os níveis de expressão dos três genes analisados na condição controle; há diferença entre os níveis de expressão de *ftsZ* e os demais genes na condição de estresse térmico; e que não há diferença significativa entre os genes na condição de estresse oxidativo (Figura 11B).

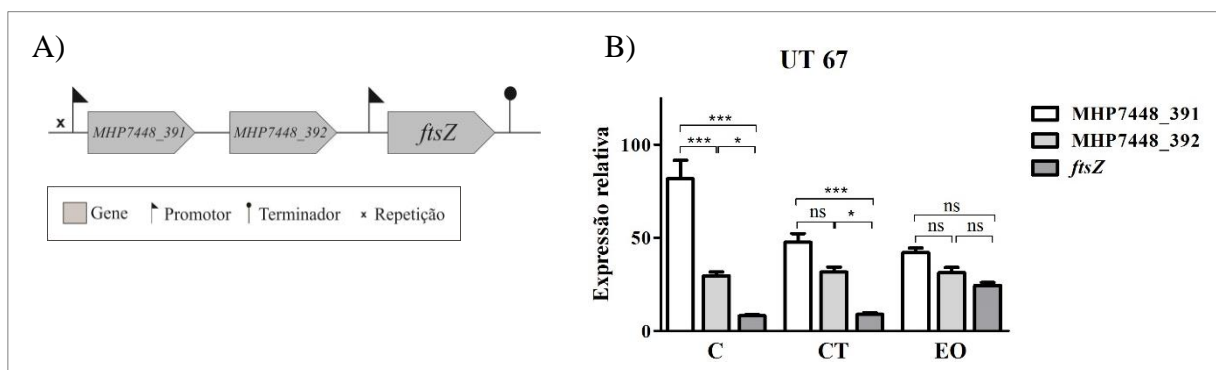


Figura 11. Unidade transcricional 67 de *M. hyopneumoniae* 7448. A) Representação da organização genômica da unidade, e B) comparação da expressão relativa dos genes da unidade. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

De modo geral é possível observar que todos os genes apresentam altos níveis de expressão relativa, o que pode ser justificado pela importância biológica destes genes para a

célula. Dentre eles, o gene MHP7448_391 apresentou o maior valor de expressão relativa, sendo mais acentuado na condição de cultivo controle, o que poderia ser justificado pela existência de repetições preditas à montante de seu promotor (CATTANI *et al.*, 2016).

Devido a importância de *ftsZ* na célula como proteína de divisão celular, a existência de um promotor próprio pode ser uma garantia da presença do seu transcrito na célula em quantidades controladas e precisas, independente da condição em que a mesma se encontra. Interessantemente, este gene apresentou o menor valor de expressão relativa nas três condições apesar da existência de promotor e terminador próprios.

Como pode ser visto nos gráficos de expressão relativa individual de cada gene desta unidade, o gene MHP7448_391 apresentou diminuição do nível de expressão relativa nas condições de estresse térmico e oxidativo ($P < 0,05$). O nível de expressão de MHP7448_392 se manteve constante nas três condições analisadas. Enquanto que o gene *ftsZ* apresentou aumento do nível de expressão relativa na condição de estresse oxidativo ($P < 0,05$) (Figura 12). Também é possível observar que os três genes possuem altos valores de expressão relativa, demonstrando que seus transcritos são altamente expressos. Por se tratarem de proteínas de divisão celular este comportamento é coerente visto que a célula necessita constantemente de seus produtos.

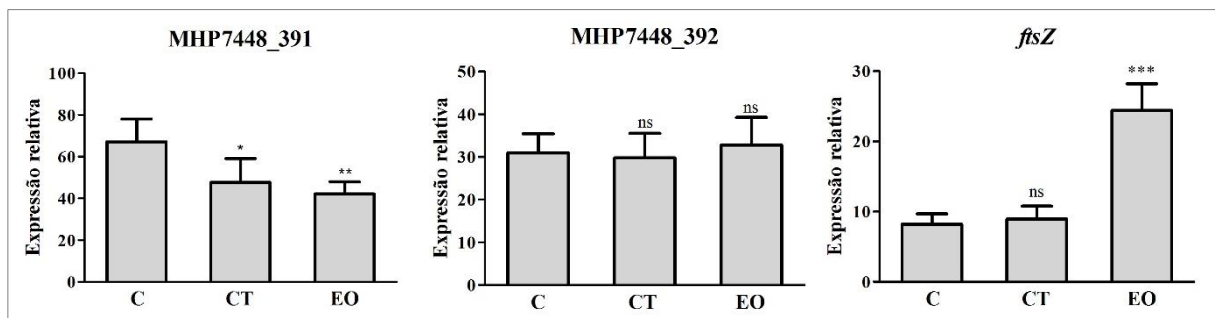


Figura 12. Expressão relativa dos genes da UT 67. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

4.9 Perfil transcricional da UT 91

A UT 91 possui organização gênica do tipo 1 e é composta pelos genes *deoC*, *upp*, MHP7448_525, *lon* e *tuf*, sendo todos eles analisados neste trabalho (Figura 13A). Os resultados obtidos através de RT-qPCR mostram que há diferenças significativas entre os

níveis de expressão relativa dos genes analisados quando comparados ao gene *tuf* (Figura 13B). Também há diferença significativa entre o gene *lon* e os demais, e entre *upp* e os genes *deoC* e MHP7448_525 nas condições controle e de estresse térmico (Figura 13C).

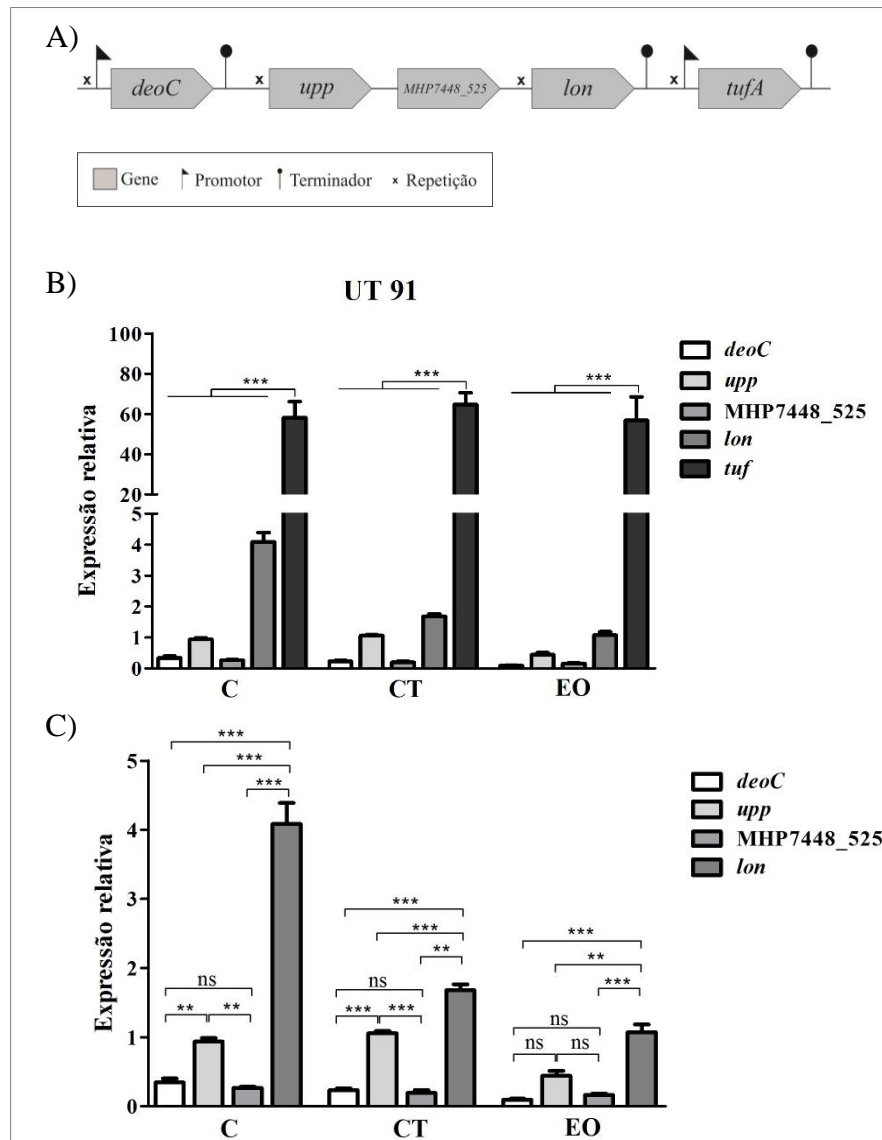


Figura 13. Unidade transcricional 91 de *M. hyopneumoniae* 7448. A) Representação da organização genômica da unidade, B) comparação da expressão relativa dos genes da unidade, e C) comparação dos genes da mesma unidade, desconsiderando *tuf*. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

Dentre os genes analisados, *tuf* se destaca por apresentar os maiores valores de expressão relativa nas três condições de cultivo analisadas. O papel deste gene na célula, como fator de alongação TU (EF-TU), justifica este comportamento visto que se trata de um fator necessário para a tradução proteica. Além da importância de sua função biológica, este

gene possui promotor e terminador próprios, bem como sequências repetitivas preditas à montante (CATTANI *et al.*, 2016), sugerindo que estes elementos podem estar atuando na regulação da transcrição deste gene.

Os genes *deoC*, *upp*, MHP7448_525 e *lon* compartilham o mesmo promotor, de acordo com a predição realizada anteriormente, sendo esperado níveis de expressão semelhantes (Figura 13A). Entretanto, os genes *lon* e *upp* apresentaram expressão relativa superior aos demais. Tal fato pode ser justificado pela existência de sequências repetitivas à montante destes genes (CATTANI *et al.*, 2016), que poderiam estar atuando na regulação da transcrição.

Como pode ser visto nos gráficos de expressão relativa individual de cada gene desta unidade, os genes *deoC* e *upp* apresentaram diminuição da expressão relativa nas condições de oxidativo ($P < 0,05$). O gene *lon* apresentou diminuição da expressão relativa nas condições de estresse térmico e oxidativo ($P < 0,05$). Enquanto que os genes MHP7448_525 e *tuf* não apresentaram expressão diferencial nas condições testadas (Figura 14).

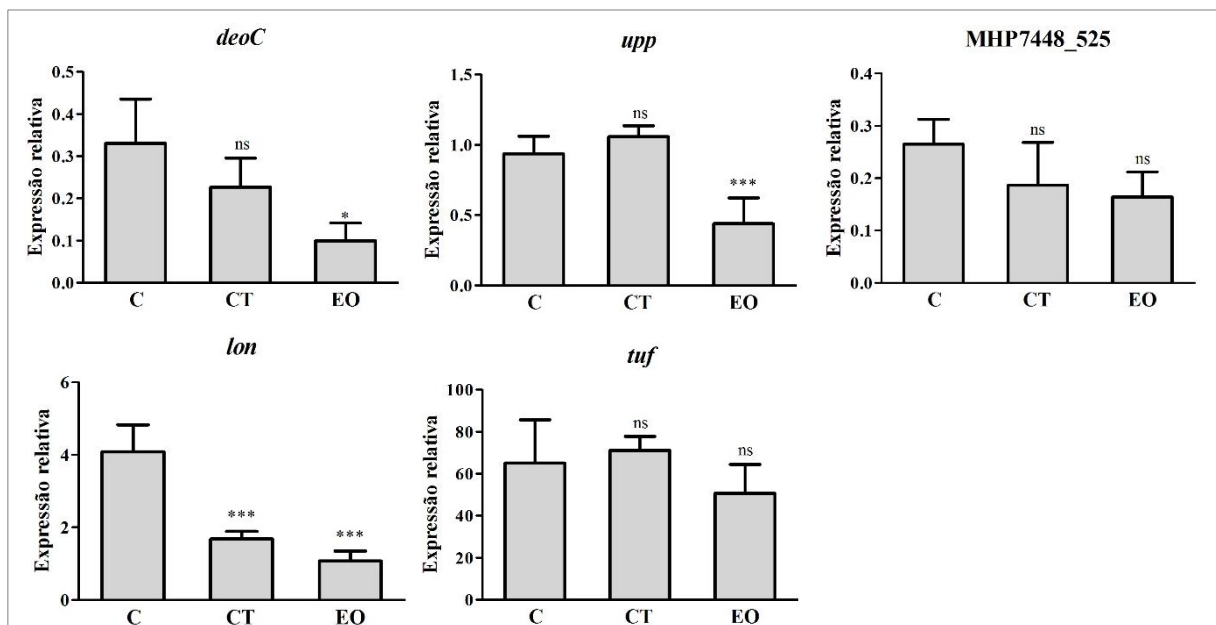


Figura 14. Expressão relativa dos genes da UT 91. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

4.10 Perfil de transcrição dos genes codificadores para adesinas

As adesinas têm papel importante na patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, uma vez que estão envolvidas na aderência das células ao epitélio do trato respiratório do suíno infectado. Neste trabalho, foram verificados os níveis de expressão relativa de cinco genes que codificam adesinas, sendo três analisados individualmente (MHP7448_496, MHP7448_513 e MHP7448_656) e dois cuja UT foi analisada por completo (MHP7448_198 e MHP7448_199).

Como pode ser visto nos gráficos de expressão relativa, os genes MHP7448_496 e MHP7448_656, que codificam as adesinas P216 e P65, respectivamente, e o gene MHP7448_513, que codifica para o precursor do antígeno de superfície 46K, não apresentaram expressão diferencial nas três condições de cultivo analisadas, sugerindo que os níveis de seus transcritos permaneçam constantes, independente da condição em que a célula se encontra (Figura 15). Interessantemente, estes três genes apresentaram altos índices de expressão relativa, quando comparados com os índices gerais dos demais genes estudados no presente trabalho, sendo MHP7448_496 o gene que atingiu o maior valor de expressão relativa. Tal observação enfatiza a importância do papel das adesinas na patogenicidade de *M. hyopneumoniae*.

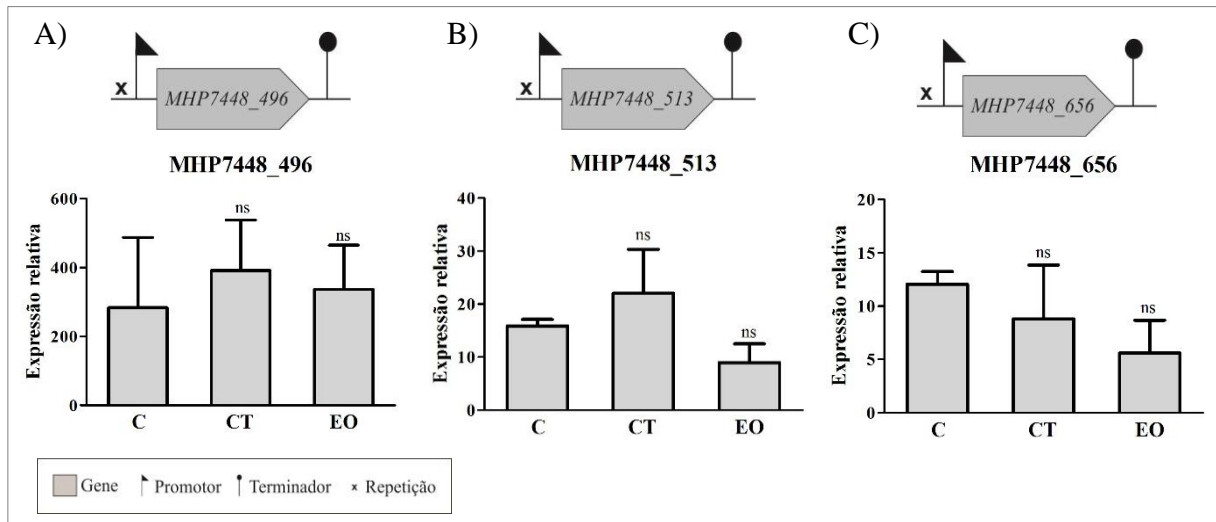


Figura 15. Representação da organização e expressão dos genes que codificam adesinas. Organização gênica e expressão relativa dos genes A) MHP7448_496, B) MHP7448_513, e C) MHP7448_656. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

A UT 28 possui organização gênica do tipo 1 e é composta pelos genes MHP7448_198 e MHP7448_199 que codificam para adesinas P97 e P102, respectivamente, e um gene hipotético (MHP7448_197), sendo todos eles analisados neste trabalho (Figura 16A). Os resultados obtidos através de RT-qPCR mostram que a expressão relativa do gene MHP7448_197 é significativamente inferior a dos outros genes da unidade nas três condições analisadas, e que os genes MHP7448_198 e MHP7448_199 têm expressões relativas semelhantes nas condições de cultivo controle e estresse térmico, entretanto na condição de estresse oxidativo o gene MHP7448_199 apresenta expressão relativa significativamente superior (Figura 16B).

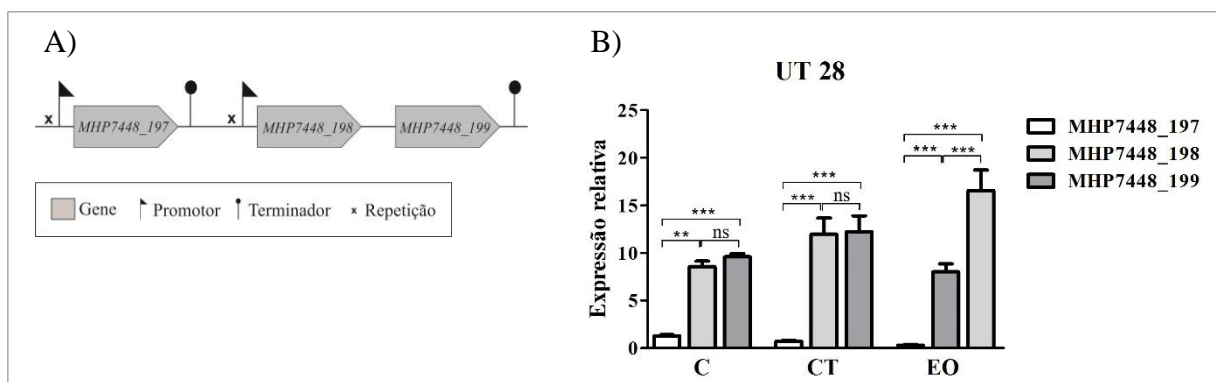


Figura 16. Unidade transcripcional 28 de *M. hyopneumoniae* 7448. A) Representação da organização genômica da unidade, e B) comparação da expressão relativa dos genes da unidade. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

Em um trabalho realizado recentemente pelo nosso grupo, o gene MHP7448_197 foi um dos alvos para determinação da atividade de sequências repetitivas no genoma de *M. hyopneumoniae*. Os resultados obtidos mostraram que as repetições preditas à montante deste gene não influenciam o seu nível de transcrição (CATTANI *et al.*, 2016). Entretanto, as sequências repetitivas preditas à montante do gene MHP7448_198 podem ter atividade e influenciar os transcritos dos genes seguintes. Além disso, os genes MHP7448_198 e MHP7448_199 são transcritos a partir do promotor à montante do gene MHP7448_197, e também a partir do promotor à montante de MHP7448_198, gerando um aumento dos níveis transcricionais destes genes. Tais hipóteses poderiam justificar a diferença de expressão relativa entre o gene MHP7448_197 e os demais genes da unidade.

O perfil de transcrição dos genes MHP7448_198 e MHP7448_199, nas condições de cultivo controle e estresse térmico, é condizente com as predições de promotores e

terminadores, uma vez que estes genes apresentam um perfil semelhante por compartilharem os mesmos elementos reguladores.

Como pode ser visto nos gráficos de expressão relativa individual de cada gene desta unidade (Figura 17), o gene MHP7448_197 apresentou expressão relativa diminuída nas condições de estresse térmico e oxidativo em relação ao cultivo controle ($P < 0,05$). O gene MHP7448_198 não apresentou diferenças significativas nos níveis de expressão relativa nas três condições analisadas. E o gene MHP7448_199 apresentou expressão relativa elevada na condição de estresse oxidativo quando comparado ao cultivo controle ($P < 0,05$) (Figura 17). O aumento deste gene nesta condição é interessante, pois se sabe que a inflamação gerada pela infecção por *M. hyopneumoniae* leva a produção de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo à célula.

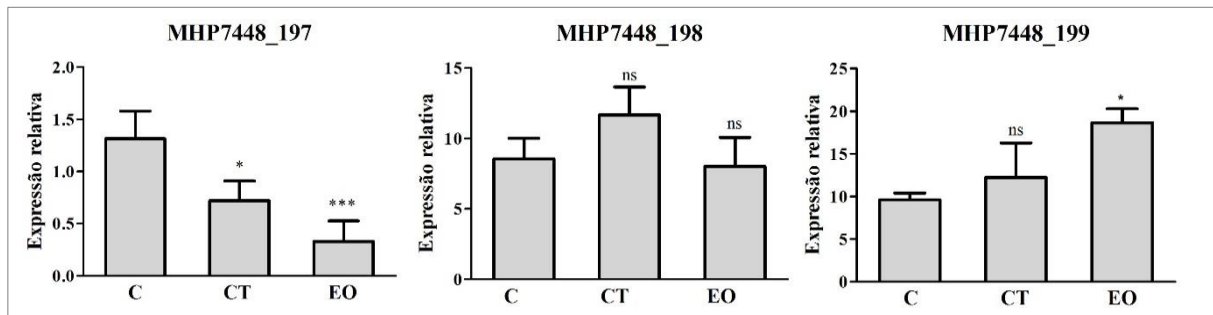


Figura 17. Expressão relativa dos genes da UT 28. Genes analisados nas condições controle (C), estresse térmico (CT) e estresse oxidativo (EO). O grau de significância da expressão do cultivo em estresse comparado ao cultivo controle é de 95 % (*), 99 % (**), 99,9 % (***), ou não significativo (ns).

5. CONCLUSÃO

As análises *in silico* permitiram a classificação de treze tipos de organização das UTs em *M. hyopneumoniae*, de acordo com a presença ou ausência de sequências promotoras e terminadoras preditas no genoma. Naturalmente, *softwares* de predição estão sujeitos a erros, levando a identificação errônea de sequências não verdadeiras e não identificação de sequências verdadeiras. Além disso, mudanças na anotação de genomas podem levar a alteração da posição de genes, interferindo assim no resultado das predições. Portanto, novas informações sobre promotores e terminadores, ou outro elementos que possam estar influenciando os níveis de expressão gênica, permitirão uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios em *M. hyopneumoniae*.

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitam a confirmação da indução das condições de estresse térmico e oxidativo, visto que foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão relativa de genes alvo no cultivo controle e nas condições de estresse. Também foi possível determinar o perfil de transcrição dos genes alvo nas três condições aqui testadas, permitindo determinar quais genes são mais transcritos e quais são diferencialmente expressos em condições de estresse térmico e oxidativo. Tais resultados permitem uma melhor compreensão do perfil transcricional de *M. hyopneumoniae* nestas condições.

Ademais, a comparação dos índices de expressão relativa dos genes de uma mesma UT permitem inferir a influência de elementos promotores e terminadores preditos *in silico* na expressão gênica de alvos específicos. Em alguns dos alvos testados tais elementos não justificam o perfil de transcrição, sugerindo a existência de outros elementos atuando como reguladores, como sequências repetitivas, por exemplo. Tais sequências podem ser alvo de proteínas reguladoras que podem estar controlando a transcrição, ou podem formar estruturas secundárias que dificultam a continuação da tradução; entretanto, mais informações são necessárias para determinação do mecanismo de regulação da transcrição destes genes.

É importante ressaltar que a regulação da expressão gênica é um processo complexo que pode ocorrer de diversas maneiras, portanto os resultados obtidos neste trabalho servem para agregar conhecimento ao tema de regulação da transcrição em *M. hyopneumoniae*.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar as análises utilizando triplicatas biológicas, objetivando um resultado mais verdadeiro, uma vez que o comportamento biológico pode variar entre os cultivos.
- Validar a predição dos elementos reguladores dos genes analisados no presente trabalho através de RT-qPCR, utilizando as abordagens dos trabalhos anteriores para validação dos promotores (WEBER *et al.*, 2012), terminadores (FRITSCH *et al.*, 2015), sequências repetitivas (CATTANI *et al.*, 2016), bem como a confirmação da organização em UTs (SIQUEIRA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2014A).
- Relacionar os resultados obtidos com as informações detalhadas de promotores (fortes ou fracos), terminadores (tc1, tc2, tc3), sequências repetitivas (em tandem, palindrômicas, etc.), de acordo com os trabalhos realizados anteriormente (WEBER *et al.*, 2012; FRITSCH *et al.*, 2015; CATTANI *et al.*, 2016), visando enriquecer a análise realizada no atual trabalho.
- Analisar a nível proteômico o efeito da regulação transcricional proposta nos alvos analisados neste trabalho.
- Expandir os genes alvo deste trabalho, permitindo uma análise ampla do genoma de *M. hyopneumoniae* quanto à influência de elementos reguladores na regulação gênica a nível transcricional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGMA, N. L.; GIRON, J. A.; THOMAS, C. A. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog*, 19(2):105-116, 1995.
- CARAFÁ, Y. A.; BRODY, E.; THERMES, C. Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators: a statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J Mol Biol*, 216(4):835-58, 1990.
- CATTANI, A. M. Elementos repetitivos na regulação da transcrição de *Mycoplasma hyopneumoniae*. 151 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2016.
- DEBEY, M. C.; ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ-cultures. *Infect Immun*, 62, pp. 5312–5318, 1994.
- DYBVIK, K.; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol*, 50:25-57, 1996.
- FRIIS, N. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med*, 27 pp. 337–339, 1975.
- FRITSCH, T. E.; SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, I. S. Intrinsic terminators in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription. *BMC Genomics*, 2015.
- GARDNER, S. W.; MINION, F. C. Detection and quantification of intergenic transcription in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology*, 156(Pt 8):2305-15, 2010.
- HOON, M. J. L.; MAKITA, Y.; NAKAI, K. & MIYANO, S. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *Plos Computational Biology*, 1(3):212-221, 2005.
- KINGSFORD C. L.; AYANBULE, K.; SALZBERG S. L. Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol*, 8:22, 2007.

- LIU, W.; FENG, Z.; FANG, L.; ZHOU, Z.; LI, Q.; LI, S.; LUO, R.; WANG, L.; CHEN, H.; SHAO, G.; XIAO, S. Complete sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J Bacteriol*, 193(4):1016-1017, 2011.
- LIU, W.; XIAO, S.; LI, M.; GUO, S.; LI, S.; LUO, R.; FENG, Z.; LI, B.; ZHOU, Z.; SHAO, G.; CHEN, H.; FANG, L. Comparative genomic analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics*, 14:80, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 2001.
- LLUCH-SENAR, M.; DELGADO, J.; CHEN, W. H.; LLORÉNS-RICO, V.; O'REILLY, F. J.; WODKE, J. A.; UNAL, E. B.; YUS, E.; MARTÍNEZ, S.; NICHOLS, R. J.; FERRAR, T.; VIVANCOS, A.; SCHMEISKY, A.; STÜLKE, J.; VAN NOORT, V.; GAVIN, A. C.; BORK, P.; SERRANO, L. Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol*, 11(1):780, 2015.
- MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology*. 152(Pt 4):937-44, 2006A.
- MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; EDWARDS, R.; MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect Immun*, 74:167-174, 2006B.
- MADSEN, M. L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E. L.; CARRUTHERS, M. D.; MINION, F. C. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect Immun*, 76:658-663, 2008.
- MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*, 126:297-309, 2008.
- MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M.; MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol*, 186(21):7123-33, 2004.

- MITRA, A.; ANGAMUTHU, K.; JAYASHREE, H. V.; NAGARAJA, V. Occurrence, divergence and evolution of intrinsic terminators across the eubacteria. *Genomics*, 94:110-116, 2009.
- MITRA, A.; KESARWANI, A. K.; PAL, D.; NAGARAJA V. WebGesTer DB – A transcription terminator database. *Nucleic Acids Res*, 39, 2011.
- 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. *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential. *Vet Microbiol*, 154:282–291, 2011.
- NATHUES, H.; DOEHRING, S.; WOESTE, H.; FAHRION, A.S.; DOHERR, M.G.; GROSSE BEILAGE, E. Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet Scand*, 55, 2013.
- NAVILLE, M.; GHUILLOT-GAUDEFFROY, A.; MARCHAS, A. & GAUTHERET, D. ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biology*, 8:11-13, 2011.
- ONEAL, M. J.; SCHAFER, E. R.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. *Microbiology*. 154(Pt 9):2581-8, 2008.
- RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Biosci Rep*, 19(5):367-372, 1999.
- SCHAFER, E. R.; ONEAL, M. J.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 2007.
- SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; MAES, D.; DELLAGOSTIN, O. A. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. *Vet Microbiol*, 165:234-242, 2013.
- SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S. *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription unit organization: genome survey and prediction. *DNA Research*, 2011.

SIQUEIRA, F. M.; THOMPSON, C. E.; VIRGINIO, V. G.; GONCHOROSKI, T.; REOLON, L.; ALMEIDA, L. G.; DA FONSECA, M. M.; DE SOUZA, R.; PROSDOCIMI, F.; SCHRANK, I. S.; FERREIRA, H. B.; DE VASCONCELOS, A. T.; ZAHA, A. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics*. 1186/1471-2164-14-175. 2013.

SIQUEIRA, F. M.; WEBER, S. S.; CATTANI, A. M.; SCHRANK, I. S. Genome organization in *Mycoplasma hyopneumoniae*: identification of promoter-like sequences. *Molecular Biology Reports*, 2014A.

SIQUEIRA, F. M.; GERBER, A. L.; GUEDES, L. R.; ALMEIDA, L. G.; SCHRANK, I. S.; VASCONCELOS, A. T.; ZAHA, A. Unravelling the transcriptome profile of the swine respiratory tract mycoplasmas. *PLoS One*, 2014B.

TACCHI, J. L.; RAYMOND, B. B.; JAROCKI, V. M.; BERRY, I. J.; PADULA, M. P., *et al.* Cilium Adhesin P216 (MHJ_0493) is a target of ectodomain shedding and aminopeptidase activity on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Proteome Res*, 13(6):2920–2930, 2014.

THACKER, E.L.; MINION, F.C. *Mycoplasmosis* J. Zimmerman (Ed.), *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 779–797, 2010.

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., *et al.* Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. In *J Bacteriol* (United States), pp. 5568-5577, 2005.

WEBER, S. S.; SANT'ANNA, F. H.; SCHRANK, I. S. Unveiling *Mycoplasma hyopneumoniae* promoters: sequence definition and genomic distribution. *DNA Research*, 2012.

WEINER, J. III; HERRMANN, R.; BROWNING, G. F. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, 28, 4488 – 96, 2000.

WILTON, J.; JENKINS, C.; CORDWELL, S. J.; FALCONER, L.; MINION, F. C., *et al.* Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 71:566–582, 2009.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51(2):221-271, 1987.

WOLF, M.; MULLER, T.; DANDEKAR, T.; POLLACK, J. D. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (Pt 3): 871-875, 2004.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 5ª Ed. Porto Alegre, Artmed, 2014. 403 p.