

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Biotecnologia
Trabalho de Conclusão de Curso

**Identificação e expressão heteróloga de um domínio de ligação à
matriz extracelular predito de uma proteína secretada de
*Mycoplasma hyopneumoniae***

Sofia Nóbrega de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, julho de 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Biotecnologia
Trabalho de Conclusão de Curso

**Identificação e expressão heteróloga de um domínio de ligação à
matriz extracelular predito de uma proteína secretada de
*Mycoplasma hyopneumoniae***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia com Habilitação
em Biotecnologia Molecular

Sofia Nóbrega de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, julho de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Clélia e Marcelo, por serem meus maiores exemplos, por terem me fornecido as ferramentas com as quais construí tudo que sou hoje, por terem me incentivado a perseguir meus objetivos não importando o quão grandes eles fossem, por sempre acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei.

Ao Pedro, por todo o carinho e paciência, por ver em mim todo o potencial do mundo, por estar do meu lado sempre que eu precisei e por todas as caronas pro laboratório sábado de manhã quando minhas bactérias precisavam de mim.

Ao meu orientador Prof. Henrique Ferreira, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, por ter acreditado no meu potencial e por todos os ensinamentos durante esse período.

À Jessica Paes, por toda a dedicação e pela paciência em me auxiliar e transmitir os conhecimentos para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 210, 206 e 204 por todas as vezes que estiveram disponíveis para responder minhas dúvidas (que não foram poucas).

Aos meus colegas de graduação pelas muitas vezes em que escutaram minhas crises e me aconselharam, pelas vezes que foram um ombro amigo quando ninguém de fora do curso parecia entender as nossas angústias, pelo companheirismo e pelos momentos felizes que compartilhamos e que fizeram o caminho até aqui muito mais leve.

Aos meus amigos queridos que me conhecem como ninguém nesse mundo, por terem sido fundamentais em todos os momentos e sem os quais a alegria dessa conquista não seria a mesma.

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES) e causador de grandes perdas econômicas na suinocultura a nível mundial. As medidas profiláticas atualmente disponíveis consistem principalmente na vacinação dos rebanhos com bacterinas e administração de antimicrobianos, ambas as quais oferecem apenas proteção parcial contra a doença e não são capazes de impedir a sua transmissão. Majoritariamente, o controle da PES consiste na otimização das práticas de manejo e acondicionamento dos rebanhos de forma a reduzir a disseminação da doença, bem como no diagnóstico precoce de infecções. Neste contexto, se faz necessária a caracterização funcional e imunológica de novos antígenos de *M. hyopneumoniae* visando o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico e métodos de imunização mais eficazes. Análises de proteômica comparativa realizadas entre *M. hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare*, a qual é uma espécie não-patogênica e proximamente relacionada, demonstram que a patogenicidade de *M. hyopneumoniae* pode estar relacionada com domínios diferenciais presentes em proteínas expostas envolvidas com o reconhecimento, adesão e ativação de componentes da superfície celular ou da matriz extracelular do hospedeiro. Levando isso em conta, foram realizadas análises comparativas entre os repertórios de proteínas solúveis secretadas por ambas as espécies, a partir dos quais a proteína não caracterizada Mhp308 foi selecionada como um novo alvo de estudo devido à predição de um domínio de ligação a matriz extracelular em sua sequência. O alinhamento de sequências proteicas revelou que o domínio predito se apresenta conservado em outras espécies patogênicas de micoplasmas e ausente em *Mycoplasma flocculare*. Foram realizadas predições *in silico* que identificaram a presença de epítomos potencialmente antigênicos na região da Mhp308 que contém o domínio de ligação predito. A sequência de DNA codificadora da região da Mhp308 que abrange o domínio de ligação foi produzida em sua forma recombinante visando à utilização em ensaios funcionais e imunológicos para investigar sua possível atuação como fator de virulência e relevância para desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico, bem como auxiliar na elucidação dos componentes envolvidos com o processo de infecção e estabelecimento da PES.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia (PEP) and responsible for great losses in swine production worldwide. The main prophylactic practices currently available consist of vaccination using bacterins and antimicrobial administration, both of which are only able to offer partial protection against the disease and are unable to prevent its transmission. Mostly, the control of PEP consists of the optimization of the managing and housing practices in order to avoid disease spreading, as well as the early diagnosis of infections. Considering this context, it is necessary to characterize functionally and immunologically new *M. hyopneumoniae* antigens in order to develop more efficient immunodiagnostic tests and immunization methods. Comparative proteomics analyses performed between *M. hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*, which is a non-pathogenic and closely related species, have demonstrated that *M. hyopneumoniae* pathogenicity could be related to differential domains present in exposed proteins that are involved with the recognition, adhesion and activation of components from host's cellular surface or extracellular matrix. Taking this into account, comparative analyses were performed between the soluble secreted repertoires from both species, from which the uncharacterized protein Mhp308 has been selected as a new target of study due to the prediction of an extracellular binding domain in its sequence. Protein sequence alignment revealed that the predicted domain is conserved among other pathogenic species of micoplasmas and absent in *Mycoplasma flocculare*. Furthermore, using an *in silico* approach, potentially antigenic epitopes have been predicted in the region of Mhp308 which contains the predicted binding domain. The DNA coding sequence from the region of Mhp308 that contains the predicted domain has therefore been recombinantly produced aiming utilization in functional and immunologic essays in order to analyze its possible role as a virulence factor and relevance as a candidate for the development of new immunodiagnostic tests, as well as help to elucidate the components involved in the process of infection and establishment of PEP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O gênero <i>Mycoplasma</i>	11
1.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e a pneumonia enzoótica suína.....	13
1.3 Fatores de virulência de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	17
1.4 Interação entre <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e o hospedeiro	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Análise <i>in silico</i> das proteínas secretadas <i>in vitro</i> por <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> visando à seleção de alvo para estudos funcionais e imunológicos.....	23
4.2 Análises <i>in silico</i> do domínio de interesse predito	24
4.3 Amplificação e clonagem de parte da CDS da Mhp308.....	24
4.4 Padronização da expressão da Mhp308D recombinante	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Seleção e descrição de uma proteína não caracterizada contendo um domínio predito de ligação à matriz extracelular	27
5.2 Caracterização do domínio predito de ligação à matriz extracelular	29
5.3 Amplificação e clonagem de parte da CDS da Mhp308 no vetor pGEX-4T3.....	31
5.4 Expressão de rMhp308D	33
6. CONCLUSÕES	35
7. PERSPECTIVAS	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
9. APÊNDICE	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática da proteína Mhp308	28
Figura 2 Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas à Mhp308 de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	29
Figura 3 Predição de epítomos antigênicos reconhecidos por linfócitos B em Mhp308	30
Figura 4 Amplificação e confirmação da clonagem de <i>mhp308D</i>	32
Figura 5 Avaliação da expressão da rMhp308D nas linhagens de <i>E. coli</i> BL21-(DE3) pLyse e RIL	34
Figura 6 Avaliação da solubilidade da rMhp308D com o uso de diferentes concentrações de sarcosil	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas etapas de amplificação e clonagem de <i>mhp308D</i>	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDRS:** complexo das doenças respiratórias dos suínos
- CDS:** sequência de DNA codificadora
- COG:** agrupamentos de grupos ortólogos (*clusters of orthologous groups*)
- D:** domínio de ligação à matriz extracelular predito *in silico* na proteína Mhp308
- DNA:** ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DTT:** ditioneitol
- ELISA:** ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- GST:** glutationa-S-transferase (*glutathione-S-transferase*)
- IPTG:** isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (*isopropyl β -D-thiogalactopyranoside*)
- kb:** quilobase(s), 1.000 pares de bases
- kDa:** quilodalton(s), 1.000 daltons
- Mhp308D:** parte da sequência peptídica da proteína Mhp308 na qual está contida o domínio predito de ligação à matriz extracelular
- MS:** espectrometria de massas (*mass spectrometry*)
- OD:** densidade óptica (*optical density*)
- pb:** par(es) de bases
- PBS:** solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffer saline*)
- PCR:** reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
- PES:** pneumonia enzoótica suína
- PCV2:** circovírus suíno tipo 2 (*porcine circovirus 2*)
- PRRSV:** vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)
- rMhp308D:** versão recombinante do peptídeo Mhp308D
- SAP:** fosfatase alcalina de camarão (*shrimp alkaline phosphatase*)
- SDS:** dodecil-sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
- SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
- TEV:** *Tobacco etch virus*
- Trp:** triptofano (*tryptophan*)

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Mycoplasma*

O gênero *Mycoplasma* é composto por bactérias que se distinguem fenotipicamente das demais por seu tamanho reduzido e ausência total de parede celular, sendo por consequência incluídas na classe *Mollicutes* (do latim *mollis*, macio; *cútis*, pele) (Razin *et al.*, 1998). A ausência de parede celular explica muitas das características presentes em micoplasmas, como sensibilidade ao estresse osmótico e a detergentes, formação de colônias irregulares e resistência à penicilina e outros antibióticos β -lactâmicos inibidores da síntese de parede celular (Razin e Hayflick, 2010). A inexistência de parede celular também impede que micoplasmas sejam corados no teste de Gram, sendo por esse motivo classificados como bactérias Gram-negativas. Apesar disso, estudos de genômica comparativa demonstram que as espécies deste gênero estão filogeneticamente relacionadas a bactérias Gram-positivas como as pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Wolf *et al.*, 2004). Estes indícios dão suporte genético para a hipótese de que micoplasmas teriam evoluído a partir de um ancestral Gram-positivo com baixo teor de G+C (guanina e citosina) através de processos de drástica redução genômica (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007).

Os genomas de micoplasmas apresentam tamanhos que variam entre 580 kb para *Mycoplasma genitalium* (McGowin *et al.*, 2012), e 1.358 kb, para *Mycoplasma penetrans* (Sasaki *et al.*, 2002). Durante o processo de redução genômica que ocorreu ao longo da evolução de micoplasmas, foram perdidas porções consideráveis dos cromossomos das espécies ancestrais, mas foram mantidas as sequências codificadoras essenciais para a sobrevivência (Razin *et al.*, 1998). Isso tornou os genomas de micoplasmas ricos em genes altamente conservados. Devido à sua origem evolutiva, micoplasmas apresentam genomas com baixo teor de G+C, o qual varia entre 24 e 33% (Razin *et al.*, 1998). A pressão exercida pelo alto índice de A+T (adenina e timina) é responsável pela não utilização do código genético padrão, fazendo com que nestas espécies o códon UGA seja utilizado para a codificação do aminoácido triptofano e não como códon de parada (Iriarte *et al.*, 2011).

O processo de redução do genoma de micoplasmas ocasionou a perda de algumas vias metabólicas como as rotas de síntese de purinas e o ciclo do ácido carboxílico

completo (Fadiel *et al.*, 2007), diminuindo sua capacidade de biossíntese e tornando estas espécies dependentes do microambiente em que se encontram para a obtenção de macromoléculas necessárias para seu crescimento tais como ácidos graxos, colesterol, vitaminas, precursores de aminoácidos, dentre outras (Razin *et al.*, 1998). Por esse motivo, as espécies deste gênero evoluíram de forma a adotar um modo de vida parasita, sendo amplamente encontradas em humanos e em outros animais ou plantas (Razin *et al.*, 1998). Uma vez estabelecidos em seu hospedeiro, micoplasmas podem viver de forma comensal ou ocasionar doenças, as quais costumam seguir um curso crônico de desenvolvimento que raramente leva à morte do organismo infectado (Razin e Hayflick, 2010). A maior parte das espécies que infectam mamíferos apresenta alta especificidade quanto ao hospedeiro e tecido, colonizando com maior frequência a superfície epitelial de mucosas tais como as do trato respiratório e genital (Citti e Blanchard, 2013).

Durante o processo de evolução e adaptação ao modo de vida parasita, espécies de micoplasmas que colonizam organismos eucarióticos desenvolveram estratégias para interação e adesão às células do hospedeiro e para evasão do sistema imune (Razin *et al.*, 1998, Rottem, 2003). A citoadesão é o pré-requisito inicial para a colonização e infecção, sendo necessária para o estabelecimento tanto de espécies que atuam como parasitas extracelulares quanto para as que possuem capacidade de penetrar e ocupar a região intracelular (Baseman *et al.*, 1995, Zielinski e Ross, 1993). Em diversas espécies de micoplasmas identificadas como patogênicas, a perda da capacidade de adesão através de mutações leva a perda da capacidade de infecção (Rottem, 2003), fazendo com que nestas espécies os mecanismos de adesão sejam considerados os seus principais fatores de virulência. Devido à ausência de parede celular, a membrana plasmática destas bactérias atua como a principal interface de interação entre patógeno e hospedeiro (Citti e Blanchard, 2013) e mediadora do processo de adesão. Este ocorre através da interação entre adesinas bacterianas e receptores de membrana do hospedeiro, podendo contar também com a participação de moléculas acessórias, motivo pelo qual a identificação e o estudo destas proteínas constituem uma das etapas fundamentais para compreensão do processo de desenvolvimento de doenças causadas por micoplasmas. Outra característica fundamental para o estabelecimento e permanência de micoplasmas no organismo hospedeiro é a capacidade de evadir e modular a resposta imune, fazendo com que a bactéria não seja

eficientemente reconhecida e eliminada. Devido aos genomas reduzidos destas espécies, estratégias de evasão baseadas em regulação gênica e geração de mutações aleatórias não estão presentes, encontrando-se substituídas por um mecanismo de geração de variação antigênica que consiste no acoplamento de conjuntos de genes com mudanças genéticas rápidas e reversíveis, os quais dão origem a um grande número de variantes de superfície celular em uma população isogênica (Citti *et al.*, 2010). Além disso, no que se refere à modulação da resposta imune gerada contra a bactéria, micoplasmas são capazes de induzir ou suprimir a síntese de citocinas através da ação de modulinas como as lipoproteínas ancoradas à membrana (Rottem, 2003).

1.2 *Mycoplasma hyopneumoniae* e a pneumonia enzoótica suína

Mycoplasma hyopneumoniae é um patógeno hospedeiro-específico encontrado no trato respiratório de suínos (Stemke e Robertson, 1990) e agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), sendo também considerado um dos patógenos mais clinicamente relevantes no complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) juntamente com o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) (Chae, 2016). A prevalência de *M. hyopneumoniae* varia entre 38% e 100% em praticamente todas as áreas de criação de suínos (Simionatto *et al.*, 2013), fazendo da PES e do CDRS duas das principais preocupações para a suinocultura a nível mundial.

A PES é uma doença crônica altamente contagiosa que atinge até 80% das criações de suínos ao redor do mundo (Thacker *et al.*, 1999) e caracteriza-se por altos índices de morbidade e baixa mortalidade. Sua ocorrência é responsável por consideráveis perdas econômicas na suinocultura devido ao aumento no uso de antibióticos e à diminuição do desempenho dos animais (Maes *et al.*, 2008), uma vez que as quedas na produtividade podem chegar a 20% sobre a taxa de conversão alimentar e 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e da ocorrência de coinfeções (Sobestiansky *et al.*, 2007). A transmissão da doença ocorre majoritariamente através de transferência horizontal de suínos infectados para não infectados, podendo também ocorrer transmissão vertical de fêmeas infectadas para sua prole durante a fase de aleitamento (Nathues *et al.*, 2013).

As principais características da PES são o aparecimento de lesões pulmonares e a tosse crônica, além da redução na taxa de ganho de peso corporal e diminuição da eficiência de conversão alimentar (Maes *et al.*, 2008) citadas no parágrafo anterior. O desenvolvimento da doença inicia-se com a colonização do epitélio ciliado do trato respiratório inferior, como as superfícies mucosas da traqueia, brônquios e bronquíolos. A aderência de células de *M. hyopneumoniae* ao epitélio ciliado estimula uma resposta inflamatória crônica, causando ciliostase, perda de cílios, necrose tecidual e consequente perda da função protetora do aparato mucociliar respiratório (DeBey *et al.*, 1992, DeBey e Ross, 1994). Os efeitos decorrentes da indução de uma resposta inflamatória prolongada juntamente com a supressão e modulação da resposta imune geradas pela infecção por *M. hyopneumoniae* (Thacker, 2001) predispõem o animal a coinfeções com outros patógenos virais ou bacterianos como *Pasteurella multocida* (Amass *et al.*, 1994), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ciprián *et al.*, 1994), PRRS (Thacker, 2004) e PCV2 (Opriessnig *et al.*, 2004), levando a um agravamento do quadro clínico, geralmente identificado pelo aparecimento de febre.

O controle e a prevenção da PES são dependentes da eficiência dos métodos de diagnóstico empregados (Sibila *et al.*, 2009). Os primeiros indícios de infecção em uma criação de suínos podem ser sinais clínicos ou lesões pulmonares observadas após o abate ou autópsia (Sørensen *et al.*, 1997). A avaliação das lesões pulmonares é utilizada como uma forma de estimar a incidência de PES e a severidade da doença a nível de rebanho, no entanto a inspeção visual das lesões está limitada à etapa final da produção, não sendo capaz de fornecer dados sobre a saúde dos animais ao longo do período de crescimento e ganho de peso (Garcia-Morante *et al.*, 2016). Além disso, lesões pulmonares não são patognomônicas de infecção por *M. hyopneumoniae*, uma vez que lesões semelhantes podem ser causadas por outros patógenos como o vírus da influenza suína (Thacker *et al.*, 2001), impedindo que sejam utilizadas para um diagnóstico preciso. De forma similar, a presença de outros patógenos bacterianos como *Actinobacillus pleuropneumoniae* pode levar a um quadro de pleurite capaz de mascarar as lesões da PES, induzindo resultados falso-negativos (Sørensen *et al.*, 1997). Atualmente, a cultura de *M. hyopneumoniae* a partir de amostras de pulmões de suínos abatidos é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico devido à sua maior sensibilidade em comparação com outros métodos de

detecção (Sørensen *et al.*, 1997). Entretanto, o isolamento de *M. hyopneumoniae* é dificultado por seu crescimento fastidioso mesmo com a utilização de meio de cultura especializado (4-8 semanas para o isolamento da bactéria a partir de amostras de campo) (Sibila *et al.*, 2009) e pela alta taxa de ocorrência de contaminação da cultura com outros micoplasmas encontrados no trato respiratório de suínos como *M. hyorhinis* e *M. flocculare* (Maes *et al.*, 2008), desencorajando sua utilização rotineira. Por esse motivo, alternativas ao diagnóstico por cultivo baseadas na identificação sorológica ou em técnicas moleculares são mais comumente utilizadas para determinar a presença ou ausência de *M. hyopneumoniae* em uma amostra. Métodos baseados em ELISA são amplamente utilizados no sorodiagnóstico de PES a partir da detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* (Sibila *et al.*, 2009), sendo os mais comuns o kit comercial de ELISA de bloqueio (IDEI, Mycoplasma hyopneumoniae EIA kit, Oxoid) baseado em um anticorpo monoclonal que reage especificamente contra um epítipo de *M. hyopneumoniae* (Feld *et al.*, 1992) e dois tipos de ELISA indireto, um deles disponível comercialmente (HerdCheck, IDEXX) e outro produzido em laboratório a partir de antígenos de *M. hyopneumoniae* purificados com o detergente Tween-20 (Nicolet *et al.*, 1980). Apesar da alta especificidade proporcionada pelos três tipos de testes, algumas limitações das técnicas são a baixa sensibilidade (entre 35% e 63%) (Erlandson *et al.*, 2005), a impossibilidade de diferenciar sorologicamente animais vacinados de animais infectados, a variação na detecção dependendo da linhagem de *M. hyopneumoniae* (Sibila *et al.*, 2009) e ocorrência de reatividade cruzada com *M. flocculare* e *Mycoplasma hyosynoviae* (Neto *et al.*, 2014). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, o diagnóstico através de PCR baseado em regiões espécie-específicas do DNA ribossomal 16 S de *M. hyopneumoniae* (Calsamiglia *et al.*, 1999) surgiu como uma alternativa confiável, rápida e barata para detecção da bactéria a partir de raspagens traqueo-bronquiais ou fluido de lavagem bronqueoalveolar (Sibila *et al.*, 2009).

O controle da PES consiste majoritariamente na otimização das práticas de manejo e acondicionamento dos rebanhos de forma a reduzir a disseminação da doença em associação com o uso de antimicrobianos e vacinação (Maes *et al.*, 2008). Uma vez que *M. hyopneumoniae* localiza-se aderido à superfície mucosa do trato respiratório, apenas antimicrobianos capazes de atingir altas concentrações no muco e nas secreções apresentam eficiência *in vivo* (Simionatto *et al.*, 2013). Devido à ausência de parede celular, *M.*

hyopneumoniae é insensível ao tratamento com antibióticos β -lactâmicos como penicilina e cefalosporina, e por este motivo antimicrobianos capazes de inibir a síntese proteica são os mais indicados (Burch, 2004). Tetraciclinas e macrolídeos são amplamente utilizados tanto de forma profilática quanto terapêutica no controle da PES e outras doenças respiratórias (Vicca *et al.*, 2004), apesar da existência de estudos que sugerem eficiência variável e desenvolvimento de resistência (Inamoto *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1997, Vicca *et al.*, 2004, Thacker *et al.*, 2006). Animais tratados com antimicrobianos eficazes costumam apresentar menos sinais clínicos, lesões pulmonares e coinfeções (Ciprián *et al.*, 2012), no entanto a proteção obtida é apenas parcial uma vez que não é possível impedir a transmissão da doença, fazendo com que novos surtos possam ocorrer assim que o tratamento é interrompido (Simionatto *et al.*, 2013). De forma similar, as vacinas comerciais atualmente disponíveis, as quais consistem em células bacterianas inativadas (bacterinas), agem como atenuadores dos sintomas da PES, porém não são capazes de evitar a sua transmissão (Meyns *et al.*, 2006, Thacker *et al.*, 1998, Thacker *et al.*, 2000). Apesar disso, estudos apontam que a vacinação é capaz de diminuir o número de células bacterianas presentes no trato respiratório do animal infectado (Meyns *et al.*, 2006, Villarreal *et al.*, 2012), reduzindo desta forma a taxa de infecção a nível de rebanho (Maes *et al.*, 2008). Mesmo incapaz de oferecer proteção completa contra a PES, a vacinação é amplamente disseminada como forma de controle da doença, sendo aplicada em aproximadamente 70% das criações de suíno ao redor do mundo (Maes *et al.*, 2008). Tamanha popularidade é justificada pelos ganhos econômicos obtidos, uma vez que as principais vantagens da vacinação incluem aumento na taxa de ganho de peso, melhora na taxa de conversão alimentar, diminuição nos índices de mortalidade e redução dos gastos com tratamentos baseados em antimicrobianos (Maes *et al.*, 2008). Entretanto, considerando os altos custos envolvidos na produção das bacterinas devido às dificuldades do cultivo de *M. hyopneumoniae*, bem como a eficiência relativamente baixa das mesmas, estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos recombinantes surgem como uma abordagem promissora na busca por um método de imunização eficaz. Atualmente, encontram-se sequenciados os genomas de quatro linhagens de *M. hyopneumoniae* (Liu *et al.*, 2011, Minion *et al.*, 2004, Vasconcelos *et al.*, 2005), porém poucos antígenos recombinantes foram avaliados para a geração de vacinas experimentais

(Chen *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2008, Fagan *et al.*, 2001, King *et al.*, 1997, Virginio *et al.*, 2014, Marchioro *et al.*, 2014, Woolley *et al.*, 2014, Jorge *et al.*, 2014). Dentre os antígenos testados, apenas uma minoria foi utilizada em ensaios de imunização de suínos. A maior parte dos antígenos recombinantes desenvolvidos foi utilizada apenas em ensaios preliminares de imunização de camundongos buscando a avaliação dos resultados obtidos com diferentes adjuvantes e rotas de administração (Simionatto *et al.*, 2013).

1.3 Fatores de virulência de *Mycoplasma hyopneumoniae*

A palavra “virulência” é utilizada para descrever a capacidade apresentada por alguns microorganismos de causar doenças ao interagirem com seu hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 2000). Este tipo de interação é dependente de fatores do hospedeiro, em especial o seu estado imunológico, motivo pelo qual microorganismos avirulentos podem ser patogênicos ao infectarem hospedeiros imunocomprometidos e microorganismos patogênicos podem ser incapazes de causar doença em hospedeiros imunizados (Casadevall e Pirofski, 2001). A virulência também é dependente de fatores do patógeno, os chamados fatores de virulência, os quais são codificados por genes de virulência e, uma vez expressos, permitem que o microorganismo se estabeleça e se desenvolva em um determinado hospedeiro (Wassenaar e Gaastra, 2001).

Com base nas informações obtidas a partir do sequenciamento dos genomas de uma linhagem não-patogênica (J) e de linhagens patogênicas (232 e 7448) de *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos *et al.*, 2005, Minion *et al.*, 2004), uma análise genômica comparativa preliminar foi realizada com o intuito de identificar possíveis genes codificadores de fatores de virulência (Ferreira e Castro, 2007). A identificação das CDS candidatas foi realizada levando em conta fatores como descrição prévia ou existência de ortólogos já descritos, presença nas linhagens patogênicas e ausência na linhagem não-patogênica ou variação de sequência entre as linhagens, codificação de proteína antigênica ou de superfície e provável associação do produto codificado com algum dos mecanismos de patogenicidade conhecidos para *M. hyopneumoniae* (como por exemplo, adesão ao epitélio respiratório, secreção e transporte entre células da bactéria e do hospedeiro e modulação da resposta imune). Os principais potenciais fatores de virulência identificados neste estudo

correspondem a genes codificadores de adesinas, proteínas imunogênicas, antígenos variáveis, proteases e chaperonas.

Dentre os diferentes grupos de fatores de virulência preditos pela análise genômica comparativa, os genes codificadores de adesinas destacam-se devido ao caráter fundamental que o processo de adesão ao epitélio respiratório possui para o estabelecimento da bactéria no hospedeiro e desenvolvimento da PES (DeBey e Ross, 1994). Historicamente, a adesina P97 é considerada um dos principais fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* devido a sua atuação chave enquanto mediadora do processo de citoaderência (Ferreira e Castro, 2007, Zhang et al., 1995). No entanto, a existência de uma CDS codificadora de uma forma funcional da adesina P97 no genoma da linhagem não patogênica J, a qual apresenta deficiência na capacidade de adesão, reforça o caráter multifatorial deste processo e a complexidade dos mecanismos envolvidos com a patogenicidade. Etapas de processamento pós-traducional como a fosforilações foram identificadas para 5 das adesinas analisadas, bem como a existência concomitante de etapas de processamento proteolítico para as adesinas P97 e P76 (Pinto *et al.*, 2007). Além disso, as CDS de todas as adesinas de *M. hyopneumoniae* já descritas na literatura foram identificadas por Ferreira & Castro em seu estudo de genômica comparativa tanto nas linhagens patogênicas como na linhagem não patogênica, sugerindo que a diferença na virulência estaria possivelmente relacionada com o padrão de expressão destas proteínas. Estudos de proteômica comparativa realizados com as linhagens 232 (patogênica) e J (não-patogênica) comprovaram que existem diferenças entre os padrões de expressão de adesinas entre estas linhagens (Li *et al.*, 2009).

Uma segunda classe de possíveis fatores de virulência identificados consiste nos antígenos variáveis. Estes se constituem principalmente de moléculas expostas na superfície celular as quais podem apresentar variações em regiões de sequências repetitivas em tandem entre as diferentes linhagens bacterianas, constituindo uma estratégia para evadir o sistema imune do hospedeiro (Vasconcelos *et al.*, 2005). Uma terceira classe de fatores de virulência putativos é constituída pelas proteases, as quais são capazes atuar sobre a variabilidade da população bacteriana através do remodelamento de antígenos expostos, alterando o fenótipo da superfície celular (Djordjevic *et al.*, 2004). Além disso, proteases podem atuar no processamento pós-traducional das proteínas, encaminhando-as

para a superfície da célula (Mei *et al.*, 1997). Ainda considerando a relação entre modificações pós-traducionais e patogenicidade, a classe de possíveis fatores de virulência composta pelas chaperonas apresenta proteínas capazes de atuar no processamento pós-traducional através do reenovelamento de proteínas como a P97 e outros potenciais fatores de virulência já identificados (Minion *et al.*, 2004). Além disso, a identificação de clusters de genes específicos em cada uma das linhagens analisadas, principalmente aqueles identificados diferencialmente entre linhagens patogênicas e não-patogênicas, pode ser um indício de que os produtos codificados por estas sequências estejam envolvidos ou sejam alvo de modificações relacionadas com a patogenicidade (Vasconcelos *et al.*, 2005).

1.4 Interação entre *Mycoplasma hyopneumoniae* e o hospedeiro

M. hyopneumoniae é uma bactéria desprovida de parede celular. Desta forma, a membrana plasmática atua como a principal interface de interação com as células do hospedeiro e mediadora do processo de adesão, o qual é um pré-requisito fundamental para seu estabelecimento (Razin e Hayflick, 2010). Este processo é majoritariamente mediado via interações entre adesinas das famílias P97, P102 e P159 com componentes da matriz extracelular, glicosaminoglicanos (GAGs) e fibronectina presente na superfície das células do hospedeiro (Deutscher *et al.*, 2010, Seymour *et al.*, 2012, Wilton *et al.*, 2009, Deutscher *et al.*, 2012, Burnett *et al.*, 2006, Jarocki *et al.*, 2015). A importância das adesinas no que se refere à patogenicidade de *M. hyopneumoniae* é reforçada pelo fato da linhagem não patogênica J apresentar uma redução na capacidade de adesão ao epitélio ciliado do trato respiratório do hospedeiro, sendo essa característica suficiente para impedir o desenvolvimento da doença (Zhang *et al.*, 1995). No entanto, apesar de algumas adesinas já terem tido suas sequências identificadas com base no sequenciamento dos genomas de quatro linhagens de *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos *et al.*, 2005, Minion *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2011), seus mecanismos de ação e suas contribuições específicas para a patogenicidade ainda não são completamente conhecidos.

As adesinas frequentemente passam por etapas de processamento proteolítico através das quais são gerados fragmentos proteicos capazes de se ligar a um repertório maior de componentes presentes na matriz extracelular e na superfície das células do hospedeiro

(Jarocki *et al.*, 2015, Seymour *et al.*, 2012, Deutscher *et al.*, 2012, Deutscher *et al.*, 2010, Wilton *et al.*, 2009). Dentre estes componentes, o plasminogênio destaca-se como um alvo recorrente de reconhecimento e ligação por parte de bactérias patogênicas devido a sua atividade ao ser convertido para a forma de plasmina (Raymond e Djordjevic, 2015). A plasmina é uma serino-protease responsável principalmente pela degradação de coágulos de fibrina (Verhamme *et al.*, 2015), e a capacidade que certas adesinas e outras proteínas bacterianas apresentam de estimularem sua ativação a partir da forma zimogênica de plasminogênio consiste em uma maneira de auxiliar no processos de motilidade, adesão e invasão celular (Bhattacharya *et al.*, 2012, Verhamme *et al.*, 2015). Além disso, bactérias também se utilizam das habilidades proteolíticas da plasmina para promover o remodelamento da matriz celular gerando novos sítios de interação, combater moléculas efetoras do sistema imune do hospedeiro, como as proteínas C3 e C5 que fazem parte do sistema complemento e ativar metaloproteinases da matriz que auxiliam na destruição de barreiras teciduais (Raymond e Djordjevic, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

As perdas econômicas causadas pela PES e por doenças decorrentes de coinfeções fazem das infecções por *M. hyopneumoniae* uma das maiores causas de prejuízo no setor da suinocultura a nível mundial (Simionatto *et al.*, 2013, Maes *et al.*, 2008). As medidas profiláticas atualmente disponíveis consistem na vacinação dos rebanhos com bacterinas e administração de antimicrobianos, ambas as quais oferecem apenas proteção parcial contra o patógeno e não são capazes de impedir a transmissão da doença (Maes *et al.*, 2008). Neste contexto, o controle da PES consiste majoritariamente na otimização das práticas de manejo e acondicionamento dos rebanhos de forma a reduzir a disseminação da doença (Maes *et al.*, 2008), bem como no diagnóstico precoce de infecções (Sibila *et al.*, 2009). Desta forma, o estudo dos mecanismos de infecção de *M. hyopneumoniae* visando a identificação de novos fatores de virulência bem como a avaliação de sua antigenicidade e imunogênicidade surge como uma estratégia para o desenvolvimento de métodos mais eficientes para o imunodiagnóstico precoce e, futuramente, desenvolvimento de novas formulações vacinais.

Considerando o caráter fundamental das etapas de interação entre patógeno e hospedeiro para o estabelecimento de *M. hyopneumoniae* no trato respiratório de suínos e consequente desenvolvimento da PES, a investigação funcional e imunológica de proteínas envolvidas com os processos de reconhecimento, adesão e ativação de componentes da superfície celular ou da matriz extracelular é uma abordagem promissora para a identificação de novos fatores de virulência. Uma vez identificados, estes fatores podem se tornar objetos de estudos visando analisar seu potencial para utilização em testes de imunodiagnóstico.

Análises proteômicas recentes demonstram que domínios presentes em proteínas expostas ao meio extracelular podem estar relacionados com a patogenicidade de *M. hyopneumoniae* (Leal *et al.*, 2016), motivo pelo qual proteínas que contenham domínios preditos como envolvidos em processos relacionados com a virulência surgem como candidatas a alvos de estudo. Desta forma, a investigação imunológica e funcional da proteína não caracterizada Mhp308 identificada através de espectrometria de massas a partir de sobrenadantes de culturas de *M. hyopneumoniae* tem como finalidade avaliar uma

possível atuação da mesma como fator de virulência através da atuação de um domínio de ligação à matriz extracelular predito em sua sequência e, desta forma, auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos com a patogenicidade de *M. hyopneumoniae* para além das já descritas adesinas. Para tanto, será avaliada a antigenicidade de uma versão recombinante do peptídeo Mhp308D (rMhp308D) o qual contém o domínio predito de ligação à matriz extracelular. Utilizando rMhp308D purificado serão também realizados ensaios de ligação ao plasminogênio, o qual consiste em um dos componentes presentes na matriz extracelular cuja atividade ao ser convertido em plasmina é amplamente explorada por bactérias patogênicas por auxiliar nos processos de motilidade, invasão e evasão do sistema imune.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é a caracterização imunológica e funcional de um domínio predito de ligação à matriz extracelular presente na proteína secretada Mhp308 de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

3.2 Objetivos específicos

(i) Análise *in silico* das sequências de aminoácidos de proteínas secretadas *in vitro* por *M. hyopneumoniae* e detectadas por espectrometria de massas em sobrenadantes de cultivo;

(ii) Seleção de uma proteína secretada de *M. hyopneumoniae* de interesse para estudos funcionais e imunológicos com base em predições estruturais e funcionais *in silico*;

(iii) Análises *in silico* do domínio predito;

(iv) Clonagem de região da CDS da proteína selecionada contendo a sequência codificadora do domínio predito e expressão do peptídeo recombinante em *E. coli*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análise *in silico* das proteínas secretadas *in vitro* por *Mycoplasma hyopneumoniae* visando à seleção de alvo para estudos funcionais e imunológicos

As proteínas que constituem o secretoma solúvel (Mukherjee e Mani, 2013) de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 foram identificadas a partir de sobrenadantes de cultura através de espectrometria de massas (MS) e comparadas com o repertório de proteínas identificadas para *Mycoplasma flocculare* (Paes *et al.*, 2017). As proteínas secretadas identificadas foram submetidas a análises *in silico* para a predição da localização subcelular, via de secreção, anotações funcionais e identificação de domínios. A localização subcelular das proteínas foi predita utilizando PSORTb 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>) (Yu *et al.*, 2010), incluindo a predição de topologia de membrana utilizando TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) (Käll *et al.*, 2004). A presença de peptídeo-sinal foi predita utilizando SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011), PrediSi (<http://www.predisi.de/>) e Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). A secreção por via não-clássica sem a presença de peptídeo-sinal foi predita utilizando SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (Bendtsen *et al.*, 2005). O tipo de secreção de cada proteína identificada foi classificado como “clássico” se o peptídeo-sinal foi identificado por pelo menos dois softwares e “não-clássico” se a predição via SecretomeP foi positiva e peptídeo-sinal não foi identificado por nenhum dos outros *softwares*.

A anotação funcional das proteínas conforme os agrupamentos de grupos ortólogos (COGs) foi realizada utilizando o banco de dados EggNOG 4.5 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/seqscan>) (Huerta-Cepas *et al.*, 2016). Proteínas com função desconhecida foram classificadas como não caracterizadas e analisadas quanto à presença de domínios funcionais utilizando InterPro 56.0 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Mitchell *et al.*, 2015) e Pfam 29.0 (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2016). A predição do potencial antigênico das proteínas foi realizada utilizando VaxiJen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) (Doytchinova e Flower, 2007).

Os critérios utilizados para a escolha da proteína alvo para estudos foram, em ordem hierárquica: (i) detecção exclusivamente nos extratos de sobrenadantes de cultura de *M.*

hyopneumoniae, (ii) ausência de anotação funcional, (iii) presença de domínio predito possivelmente relacionado com virulência e (iv) presença de peptídeo-sinal predito.

4.2 Análises *in silico* do domínio de interesse predito

A conservação do domínio de interesse dentro dos níveis taxonômicos foi determinada utilizando Protein Blast (BLASTP) e considerando >40% de identidade para determinação de ortólogos. O alinhamento das sequências ortólogas foi realizado utilizando ClustalIW (Chenna *et al.*, 2003). A predição de epítomos antigênicos reconhecidos por linfócitos B foi realizada utilizando BCPred (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) (El-Manzalawy *et al.*, 2008), BepiPred 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) (Jespersen *et al.*, 2017) e o método semi-empírico descrito por (Kolaskar e Tongaonkar, 1990) (<http://tools.iedb.org/bcell/>).

4.3 Amplificação e clonagem de parte da CDS da Mhp308

A amplificação de um fragmento da CDS de Mhp308 (GeneBank: AAZ53681.2) no qual está presente a sequência codificadora de um domínio predito de ligação à matriz extracelular foi realizada a partir do DNA genômico da linhagem 7448 de *M. hyopneumoniae* utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1A). Sequências de 17 ou 24 nucleotídeos homólogos ao vetor pGEX-TEV foram adicionadas às extremidades 5' dos oligonucleotídeos iniciadores de forma a atuarem com *tags* para recombinação homóloga. Foram testadas duas abordagens para a clonagem do produto de amplificação, ambas utilizando vetores plasmidiais que propiciam a expressão da proteína recombinante em fusão com uma cauda de GST na região amino-terminal. A clonagem por recombinação homóloga *in vivo* no vetor pGEX-TEV foi realizada na linhagem KC8 de *E. coli* seguindo protocolo descrito anteriormente (Parrish *et al.*, 2004). O plasmídeo pGEX-4T1-TEV é derivado do vetor de expressão pGEX-4T1 (Amersham Biosciences), porém foi modificado para incluir a sequência codificadora do sítio de clivagem da protease do *tabaco etch virus* (TEV) entre a região do sítio de clivagem e a sequência codificadora da GST. O vetor pGEX-TEV foi linearizado por clivagem com a endonuclease de restrição *XhoI* (Promega) e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina

de camarão (SAP, GE Healthcare). A clivagem dos plasmídeos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Células de *E. coli* KC8 foram transformadas por choque térmico com 50 ng do vetor pGEX-TEV linearizado e 50 ng do produto de PCR a ser clonado em 25 µl de tampão KCM (200 mM KCl; 60 mM CaCl₂; 100 mM MgCl₂). Após o choque térmico, as células foram incubadas em 1 ml de meio de cultura YT (16 g/L triptona; 10 g/L extrato de levedura; 5 g/L NaCl) a 37°C por 3 h e plaqueadas em meio seletivo com antibióticos (kanamicina 10 µg/ml e ampicilina 100 µg/ml). A clonagem tradicional utilizando endonucleases de restrição e DNA-ligase de T4 (Thermo Fischer Scientific) foi realizada conforme protocolo disponibilizado pelo fabricante. Para tal, o vetor pGEX-4T3 e o produto de amplificação foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. Posteriormente foi realizada a desforforilação do vetor pGEX-4T3 clivado utilizando SAP e em seguida o inserto e vetor clivados foram incubados em uma proporção 3:1 (respectivamente) com 5 U de DNA-ligase de T4 a 16°C por 16h. Foram utilizadas aproximadamente 10 ng de DNA proveniente da reação de ligação para transformar células de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes através de protocolo de eletroporação. Após a transformação, as células foram incubadas em 1ml de meio de cultura YT a 37°C por 1h e plaqueadas em meio seletivo com antibióticos (tetraciclina 12 µg/ml e ampicilina 100 µg/ml). As colônias obtidas a partir de ambas as técnicas de clonagem foram testadas quanto à presença de plasmídeo contendo o inserto de interesse através de PCR de colônia utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores complementares a regiões do vetor adjacentes ao sítio de clonagem (Tabela 1B). A extração dos plasmídeos de colônias identificadas como positivas foi realizada através de protocolo de lise alcalina utilizando 0,2 N NaOH e 1% SDS seguida de digestão com as enzimas de restrição utilizadas no passo de clonagem para confirmar a presença do inserto com o tamanho correto. A separação entre o plasmídeo linearizado e o inserto foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4 Padronização da expressão da Mhp308D recombinante

Para a etapa inicial de padronização da expressão foram utilizadas duas linhagens de *E. coli* BL21(DE3) (pLyse e RIL). As linhagens transformadas foram cultivadas em 5 ml de

meio YT com antibióticos (cloranfenicol 34 µg/ml e ampicilina 100 µg/ml) até OD₅₀₀ = 0,8. A indução da expressão foi realizada com a adição de 0,1 mM de IPTG às culturas bacterianas seguida de incubação a 37°C com agitação de 200 rpm durante 4h. Amostras coletadas antes e depois do período de indução foram analisadas através de SDS-PAGE 12%.

Para a avaliação da solubilidade do peptídeo recombinante, as linhagens transformadas foram cultivadas em 100 ml de meio YT com antibióticos e a indução da expressão foi realizada seguindo as mesmas condições descritas no parágrafo anterior. Após o período de indução, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 7.000 rpm durante 6 min a 4°C. O precipitado celular obtido foi ressuscitado em 3 ml de PBS seguido da adição de 0,5 mg/ml de lisozima e incubação em banho de gelo por 25 min. Em seguida foram adicionados 5 mM de DTT e diferentes concentrações de sarcosil 30% a cada uma das amostras. As amostras referentes às quatro condições de solubilização foram submetidas a pulsos sônicos (sonicador VC601 Sonic and Materials Inc.) em banho de gelo (8 pulsos de 30s com amplitude 40) de forma a romper as células bacterianas e os lisados foram centrifugados a 10.000 g por 20 min a 4°C para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). Foram adicionados 2% de Triton X100 aos sobrenadantes de cultura e os precipitados foram ressuscitados em 3 ml de PBS. As frações solúveis e insolúveis obtidas a partir das diferentes condições de solubilização foram analisadas através de SDS-PAGE 12%.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação e clonagem de *mhp308D*

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' → 3')	Pares de base
(A) Mhp308D	(D): TGGTTCCGCGTGGATCCCCGTAATTTAATCACAAATTTTAATTCAAATAT	50
	(R): CGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAATTAGTGGAATCTCATCATTTAATGC	51
(B) pGEX-ALT	(D): CCT GGA TGC GTT CCC AAA	18
	(R): CGA CAC CCG CCA ACA CC	17

(D) iniciador direto (R) iniciador reverso. Nucleotídeos indicados em negrito correspondem às sequências das *tags* para recombinação homóloga.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção e descrição de uma proteína não caracterizada contendo um domínio predito de ligação à matriz extracelular

Visando à identificação de novos potenciais fatores de virulência de *M. hyopneumoniae*, os resultados obtidos através das análises *in silico* de proteínas do secretoma solúvel foram analisados quanto à presença de peptídeos contendo domínios funcionais preditos possivelmente relacionados com virulência (por exemplo, domínios de peptidase ou de ligação à matriz extracelular). Uma descrição detalhada de todas as proteínas identificadas, bem como uma análise comparativa entre os secretomas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* foi publicada na revista *Journal of Proteomics* na forma de artigo científico do qual participei como terceira autora (Paes *et al.*, 2017). Maiores detalhes encontram-se disponíveis no apêndice ao final desta dissertação. *M. flocculare* consiste em uma espécie comumente encontrada no trato respiratório de suínos aderida ao epitélio ciliar, no entanto, diferentemente de *M. hyopneumoniae*, sua presença não causa danos ao hospedeiro, com o qual estabelece uma interação comensal (Siqueira *et al.*, 2013). Apesar disso, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* compartilham cerca de 78% das suas CDS e mais de 90% de seus repertórios de proteínas de superfície, além de todos os fatores de virulência descritos em *M. hyopneumoniae* encontrarem-se também presentes em *M. flocculare* (Siqueira *et al.*, 2014). Estes resultados sugerem que os diferentes modos de vida destas espécies poderiam estar relacionados com diferenças qualitativas e quantitativas nos seus repertórios de proteínas expressas.

Foram demonstradas diferenças claras entre os repertórios de proteínas secretadas por *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Diversas proteínas relacionadas com a virulência ou potencialmente relevantes através de funções *moonlighting* foram identificadas no secretoma de *M. hyopneumoniae* porém não foram detectadas no secretoma de *M. flocculare*, apesar de apresentarem ortólogos transcritos no genoma. Além disso, o secretoma de *M. hyopneumoniae* mostrou-se mais complexo, uma vez que foram identificadas 62 proteínas versus 26 identificadas para *M. flocculare*. As diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas identificadas entre os secretomas podem estar relacionadas com diferenças entre os mecanismos de secreção das duas espécies (Paes *et al.*, 2017)

Dentre as 62 proteínas identificadas por MS a partir dos sobrenadantes de culturas de *M. hyopneumoniae*, 55 foram identificadas como exclusivas (ausentes nas amostras de *M. flocculare*). Das 55 proteínas exclusivas, foram selecionadas as 24 proteínas que não apresentavam anotação funcional nem haviam sido previamente descritas como possíveis fatores de virulência (Ferreira e Castro, 2007). Das 24 proteínas, 11 apresentaram domínios funcionais preditos e 4 apresentaram sequência predita de peptídeo-sinal. A proteína Mhp308 (UniProtKB: Q4A858) foi escolhida por ser a única a apresentar tanto um domínio potencialmente envolvido com a virulência (domínio de ligação à matriz extracelular) como uma sequência identificada como peptídeo-sinal. A presença de uma sequência-sinal para o direcionamento da Mhp308 para o meio extracelular reforça a hipótese de que esta proteína estaria desempenhando alguma função ainda desconhecida ao ser secretada, a qual pode estar relacionada ao domínio de ligação à matriz extracelular. Além disso, a proteína apresentou *score* igual a 0.4723 segundo a predição de potencial antigênico realizada utilizando o *software* VaxiJen 2.0, sendo, portanto, classificada como potencialmente antigênica.

A sequência deduzida de aminoácidos da Mhp308 tem um total de 1975 resíduos, contendo em sua extremidade amino-terminal a região correspondente ao peptídeo-sinal predito, o qual se estende do resíduo de metionina 1 até o resíduo de alanina 24. O domínio predito de ligação à matriz extracelular se estende do resíduo de isoleucina 283 até o resíduo de serina 340, totalizando 58 resíduos (Figura 1). No domínio predito de ligação à matriz extracelular não há resíduos de triptofano. Esta é uma característica interessante para a expressão heteróloga da sequência codificadora correspondente, uma vez que Trp em *Mycoplasma* spp. é codificado por um códon TGA, o qual consiste em um códon de terminação no código genético universal. Isso facilita a expressão deste domínio em *E. coli*, pois não há necessidade de utilização de estratégias de mutação sítio-dirigida, como as utilizadas em outros trabalhos (Simionatto *et al.*, 2009).

Mhp308

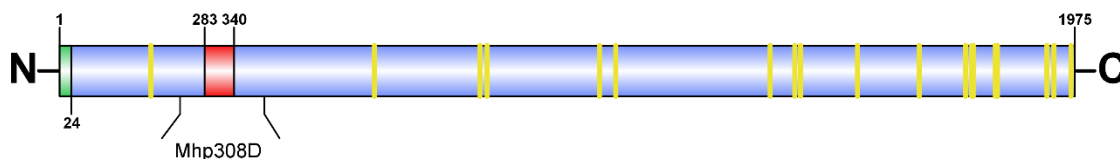


Figura 1: Representação esquemática da proteína Mhp308. A região em azul (base 1 a 1975) corresponde à CDS da Mhp308. A região em vermelho (base 283 a 340) corresponde ao domínio predito para ligação a componentes da matriz extracelular. A região em verde (base 1 a 24) corresponde à sequência predita do peptídeo-sinal. A região referente ao peptídeo Mhp308D encontra-se indicada. Regiões assinaladas em amarelo correspondem aos códons de triptofano. N: extremidade amino-terminal. C: extremidade carboxi-terminal.

5.2 Caracterização do domínio predito de ligação à matriz extracelular

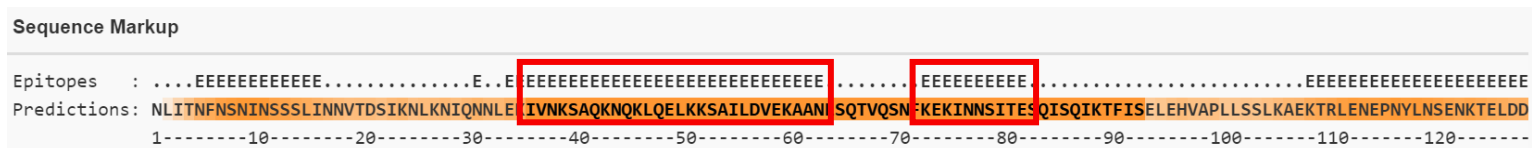
A realização de um alinhamento da proteína Mhp308 de *M. hyopneumoniae* 7448 contra o banco de dados de sequências não redundantes do Gene Bank retornou como proteínas ortólogas as sequências pertencentes à diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae* (J, 232, 7442) bem como duas outras espécies de micoplasmas patogênicas e geneticamente próximas (*M. ovipneumoniae* e *M. dispar*), as quais são encontradas no trato respiratório de ovinos e bovinos, respectivamente. Foi realizada um segundo alinhamento da proteína Mhp308 de *M. hyopneumoniae* 7448 contra o banco de dados de sequências não redundantes do Gene Bank com restrição de busca apenas por proteínas pertencentes à *M. flocculare*, o qual retornou apenas duas sequências com 26% de identidade pertencentes às linhagens 27716 e 27399. Foi realizado o alinhamento das sequências obtidas de forma a identificar o grau de conservação da região correspondente ao domínio D da proteína Mhp308 de *M. hyopneumoniae* 7448 (Figura 2). O resultado do alinhamento mostra que o domínio se encontra altamente conservado entre as linhagens de *M. hyopneumoniae*, *M. ovipneumoniae* e *M. dispar*, no entanto não está presente em nenhuma das duas linhagens de *M. flocculare*. Este resultado corrobora com a hipótese de uma possível atuação da Mhp308 no processo de virulência pela interação com componentes da matriz extracelular do hospedeiro através do domínio D, uma vez que o mesmo se encontra presente nas espécies patogênicas e ausente na espécie não-patogênica analisadas. A única exceção consiste na presença do mesmo na linhagem não-patogênica de *M. hyopneumoniae* J, no entanto sabe-se que a não-patogenicidade desta linhagem se deve à deficiência na capacidade de citoadesão, a qual é um pré-requisito para a infecção. Desta forma, mesmo que Mhp308 esteja atuando como fator de virulência, a incapacidade de aderir eficientemente às células do hospedeiro torna a linhagem não-patogênica.

<i>M. hyopneumoniae</i> 7448	I V N K S A Q K N Q K L Q E L K K S A I L D V E K A A N L S Q I V Q S N F K E K I N N S I T E S Q I S Q I K I F I S
<i>M. hyopneumoniae</i> 7442	I V N K S A Q K N Q K L Q E L K K S A I L D V E K A A N L S Q I V Q S N F K E K I N N S I T E S Q I S Q I K I F I S
<i>M. hyopneumoniae</i> 232	I V N K S A E K N Q K L Q E L K K S A I L D V E K A A N L S Q I V Q S N F K E K I N N S I T E S Q I S Q I K I F I S
<i>M. hyopneumoniae</i> J	I V N K S A Q K N Q K L Q E L K K S A I L D V E K A A N L S Q I V Q S N F K E K I N N S I A E S Q I S Q I K I F I S
<i>M. ovipneumoniae</i>	I V N K S A E K N E K L Q E L K K S A I L D V E K A A N L S Q I V Q S N F K E K I E N S I T E S Q I S Q I K E F I S
<i>M. dispar</i>	I I P E S K K N I K L I N L K K K I S E V K K F S N L S N G I I Q E L G L V N N S L T E F Q V N Q I K G I S F
<i>M. flocculare</i> 27399	-----
<i>M. flocculare</i> 27716	-----

Figura 2: Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas à Mhp308 de *M. hyopneumoniae* 7448. A região mostrada na figura corresponde à sequência do domínio D da Mhp308 de *M. hyopneumoniae* 7448 (resíduo 283 a 340).

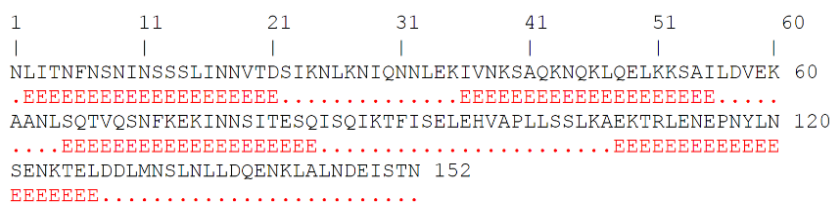
Foi realizada a predição de epítomos antigênicos reconhecidos por linfócitos B na sequência peptídica codificada pelo fragmento da CDS de Mhp308 utilizado para clonagem. As predições foram realizadas através de três *softwares* que utilizam diferentes abordagens para predição dos epítomos: similaridade com epítomos conformacionais anotados (BepiPred), aplicação de funções kernel sobre listas de sequências proteicas (BCPred) e comparação com a taxa de ocorrência de cada resíduo em epítomos determinados experimentalmente (método de Kolaskar e Tongaonkar). Os resultados obtidos a partir dos três métodos indicaram a presença de dois epítomos com valores acima do limiar de antigenicidade localizados na região da sequência peptídica que compreende o domínio D (Figura 3).

A



B

Position	Epitope	Score
36	IVNKSAQKNQKLQELKKSAILDVEKAAN	0.955
65	SQTVQSNFKKINNSITESQ	0.921
2	LITNFSNINSSSLINNVTDSIKNLKNIQNNLE	0.883
108	EKTRLENENPNYLNSENKTEL	0.872



C

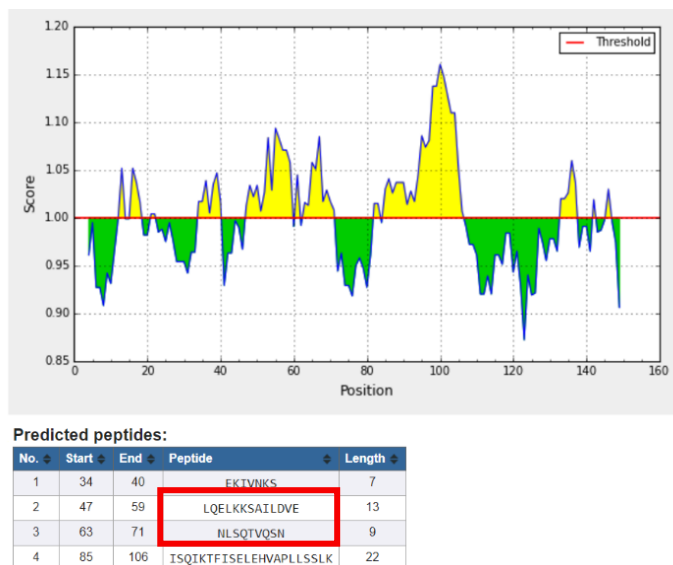


Figura 3: Predição de epítomos antigênicos reconhecidos por linfócitos B em Mhp308. (A) Resultado da predição realizada utilizando BepiPred. Resíduos indicados pela letra E correspondem àqueles preditos como potencialmente antigênicos. (B) Resultado da predição realizada utilizando BCPred (C) Resultado da predição realizada utilizando o método de Kolaskar e Tongaonkar. As sequências destacadas por retângulos vermelhos em A, B e C correspondem aos epítomos preditos dentro do domínio D.

5.3 Amplificação e clonagem de parte da CDS da Mhp308 no vetor pGEX-4T3

O par de oligonucleotídeos iniciadores previamente descrito na Tabela 1A foi utilizado para amplificar um segmento de 456 pb da CDS da proteína Mhp308 (*mhp308D*, códons 248 a 399) que inclui a sequência codificadora do domínio D. A sequência *mhp308D* codifica não apenas o domínio predito como também regiões à montante e à jusante do mesmo, totalizando 152 códons sem incluir códons codificadores de triptofano, consistindo no peptídeo Mhp308D. Através de análise do resultado da reação de PCR através de eletroforese em gel de agarose 1% foi possível observar a presença de uma banda com aproximadamente 500 pb referente ao produto de amplificação compreendendo a sequência-alvo *mhp308D* com a adição das sequências das *tags* de recombinação presentes nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos iniciadores (Figura 4A). O produto de amplificação obtido foi utilizado em protocolo de clonagem por recombinação homóloga utilizando o vetor pGEX-TEV, no entanto a amplificação de amostras de DNA extraído das colônias obtidas após a realização da clonagem utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1B não indicou a presença de potenciais clones recombinantes, uma vez que todas as colônias analisadas apresentavam apenas a banda de aproximadamente 300 pb referente ao plasmídeo sem a presença do inserto no sítio de clonagem (dados não disponíveis). Foram realizadas repetições do processo de clonagem com alterações sequenciais nas possíveis variáveis responsáveis pela não recombinação (linhagem bacteriana, soluções utilizadas, quantidade de DNA plasmidial, proporção entre a quantidade de vetor e inserto, tempo de incubação após transformação), porém não foi obtido sucesso, e por este motivo optou-se por testar outra estratégia de clonagem. A abordagem escolhida foi a clonagem tradicional mediada por DNA-ligase de T4 no vetor plasmidial pGEX-4T3. Este vetor, assim como os demais da série pGEX, apresenta características vantajosas para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* que incluem a presença de um promotor forte e eficientemente regulável, capaz de promover um alto nível de transcrição da sequência clonada quando na presença de indutor (Weickert *et al.*, 1996). Além disso, o vetor propicia a expressão da proteína recombinante em fusão com GST (Smith e Johnson, 1988), tornando possível sua posterior purificação através de cromatografia de afinidade em coluna de glutationa-Sepharose. O produto de amplificação

anteriormente descrito foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, resultando em um fragmento digerido de 402 pb o qual foi incubado juntamente com o vetor clivado e desfosforilado com SAP visando impedir a religação das extremidades coesivas geradas após a digestão enzimática. Dentre as colônias obtidas após a transformação com a reação de ligação, 46 colônias foram analisadas por PCR para identificação da presença do plasmídeo recombinante. Destas, 41 foram identificadas como positivas (Figura 4B), indicando uma alta eficiência de clonagem. Foram selecionadas seis colônias positivas para extração dos plasmídeos e digestão enzimática com *EcoRI* e *BamHI* visando à separação entre vetor e inserto como forma de confirmação da clonagem, para as quais foi confirmada a presença do inserto com tamanho correto de 402 pb (Figura 4C). Os plasmídeos extraídos a partir de três das seis colônias testadas foram escolhidos de forma aleatória para dar prosseguimento ao estudo nas etapas de testes de expressão.

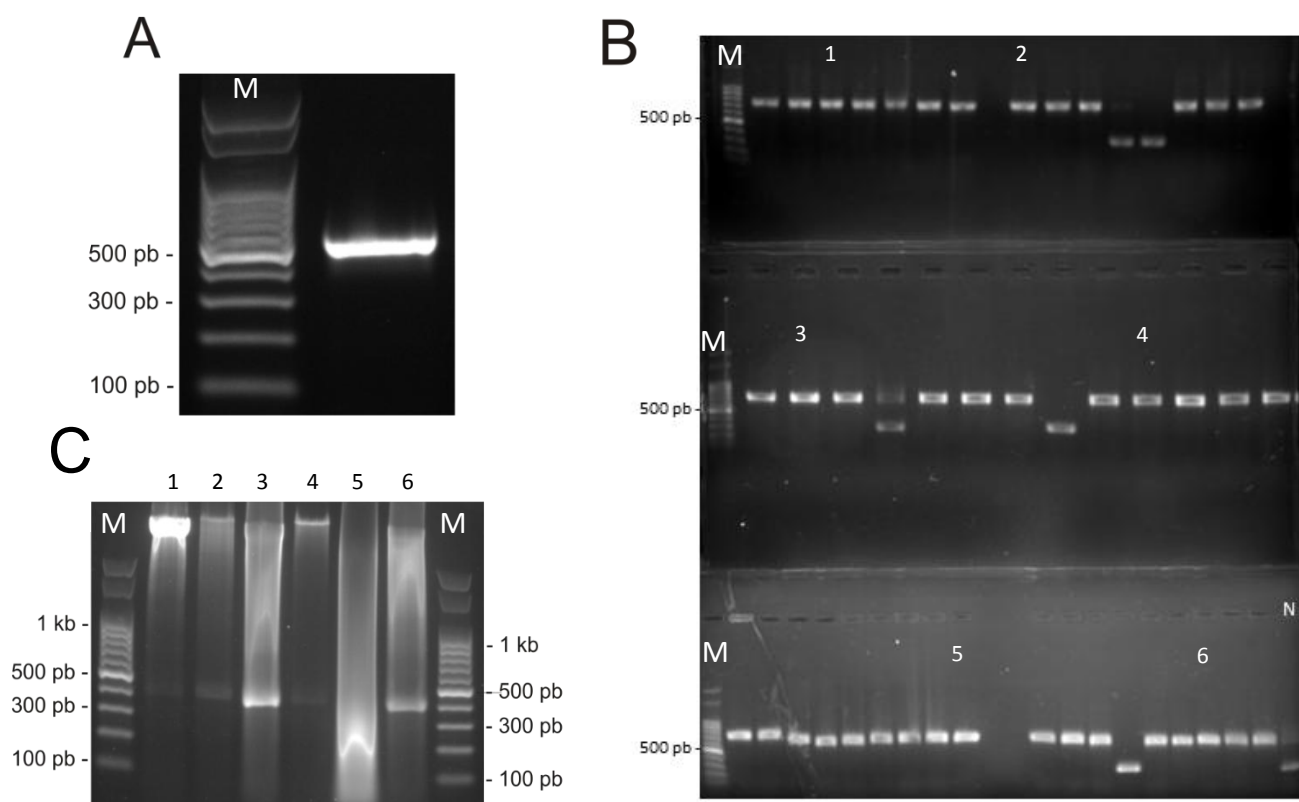


Figura 4: Amplificação e confirmação da clonagem de *mhp308D* (A) Análise eletroforética em gel de agarose 1% do produto da amplificação por PCR (B) Análise eletroforética em gel de agarose 1% da amplificação por PCR realizada com material coletado de 46 colônias potencialmente recombinantes obtidas através de clonagem mediada por DNA-ligase de T4. (N) controle negativo. Bandas com ≈ 300 pb correspondem a colônias contendo o plasmídeo sem inserto e bandas com ≈ 700 pb correspondem à colônias contendo o plasmídeo com o inserto clonado. Números correspondem aos clones selecionados. (C) Análise eletroforética em gel de agarose 1% do resultado da digestão enzimática com *BamHI* e *EcoRI* dos plasmídeos extraídos de 6 colônias obtidas após clonagem mediada por DNA-ligase de T4 identificadas como positivas por PCR. Bandas com 402 pb correspondem ao inserto, bandas com ≈ 5 kb correspondem ao plasmídeo linearizado. (M) marcador de massa molecular.

5.4 Expressão de rMhp308D

Amostras coletadas antes e depois da indução da expressão do peptídeo recombinante codificado por *mhp308* (Mhp308D) a partir das linhagens de *E. coli* BL21-(DE3) pLyse e RIL transformadas com cada um dos três plasmídeos recombinantes escolhidos foram analisadas através de SDS-PAGE 12% de forma a identificar a linhagem capaz de propiciar os maiores níveis de expressão de rMhp308D com menor taxa de formação de produtos truncados. A proteína de fusão rMhp308D-GST apresenta massa de aproximadamente 43 kDa. Tanto para a linhagem BL21-(DE3)-pLyse quanto para a linhagem BL21-(DE3)-RIL não foram identificadas diferenças entre os padrões de expressão dos três plasmídeos recombinantes testados (Figura 5). O padrão de expressão da linhagem BL21-(DE3)-RIL observado na Figura 5A demonstra que esta apresentou maior expressão de um possível produto truncado com tamanho aproximado ao esperado para a GST (≈ 27 kDa) em comparação com a linhagem BL21-(DE3)-pLyse (Figura 5B), motivo pelo qual foi dada preferência à utilização da linhagem BL21-(DE3)-pLyse. Para avaliar de forma mais precisa a existência de outros possíveis produtos truncados de expressão poderiam ser realizados ensaios de *western-blot* utilizando anticorpos anti-GST para identificar proteínas de fusão com tamanhos diferentes do esperado. Caso comprovada a existência destes produtos, o problema poderia ser minimizado através de alterações nas condições de indução como a diminuição da temperatura de incubação e a utilização de uma menor concentração de IPTG com aumento do tempo de indução.

A avaliação da solubilidade de rMhp308D-GST foi realizada utilizando extratos da linhagem BL21-(DE3)-pLyse transformada com dois dos plasmídeos recombinantes escolhidos. O impacto da adição de diferentes concentrações do detergente sarcosil (N-laurilsarcosina) como agente solubilizador foi avaliado através da comparação da intensidade da banda referente à rMhp308-GST nas frações solúvel e insolúvel através de SDS-PAGE. O sarcosil é um detergente iônico amplamente utilizado na solubilização de proteínas (Tao *et al.*, 2010) devido à sua alta capacidade de romper as interações que propiciam a formação de agregados proteicos e reduzida capacidade de desnaturação em comparação ao SDS. Foram testadas as condições de adição de 0%, 0,3%, 0,5% e 0,7% de sarcosil 30% às amostras.

Não foram identificadas diferenças perceptíveis entre as quantidades de proteínas solubilizadas entre os dois extratos de células transformadas com os dois plasmídeos testados (Figura 4). A análise eletroforética das frações solúvel e insolúvel das amostras solubilizadas com diferentes concentrações de sarcosil demonstrou que, mesmo sem a adição do detergente a proteína de fusão rMhp308D-GST encontra-se predominantemente no sobrenadante. A alta solubilidade de rMhp308D-GST está de acordo com o esperado, uma vez que a proteína Mhp308 foi identificada em amostras de sobrenadantes de cultura de *M. hyopneumoniae*, ou seja, faz parte do repertório de proteínas solúveis, e não apresenta domínios transmembranares preditos *in silico*. Desta forma, optou-se por prosseguir com a condição de preparo dos extratos lisados sem a adição de sarcosil nas etapas seguintes, visto que o mesmo pode interferir com a purificação da proteína recombinante através de cromatografia em colunas de glutationa-Sepharose.

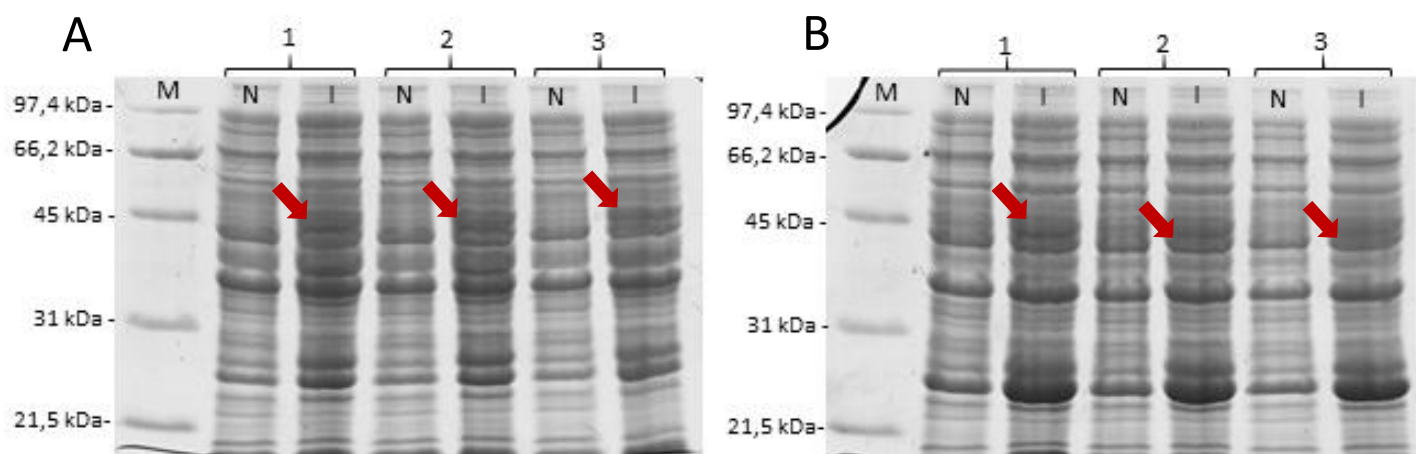


Figura 5: Avaliação da expressão da rMhp308D nas linhagens de *E. coli* BL21-(DE3) pLyse e RIL (A) Expressão na linhagem BL21-(DE3)-pLyse (B) Expressão na linhagem BL21-(DE3)-RIL (M) marcador de massa molecular (N) cultivo não induzido (I) cultivo induzido com 0,1 mM de IPTG. Os números 1, 2 e 3 se referem ao plasmídeo recombinante utilizado na transformação das linhagens. As bandas indicadas por setas correspondem à rMhp308D.

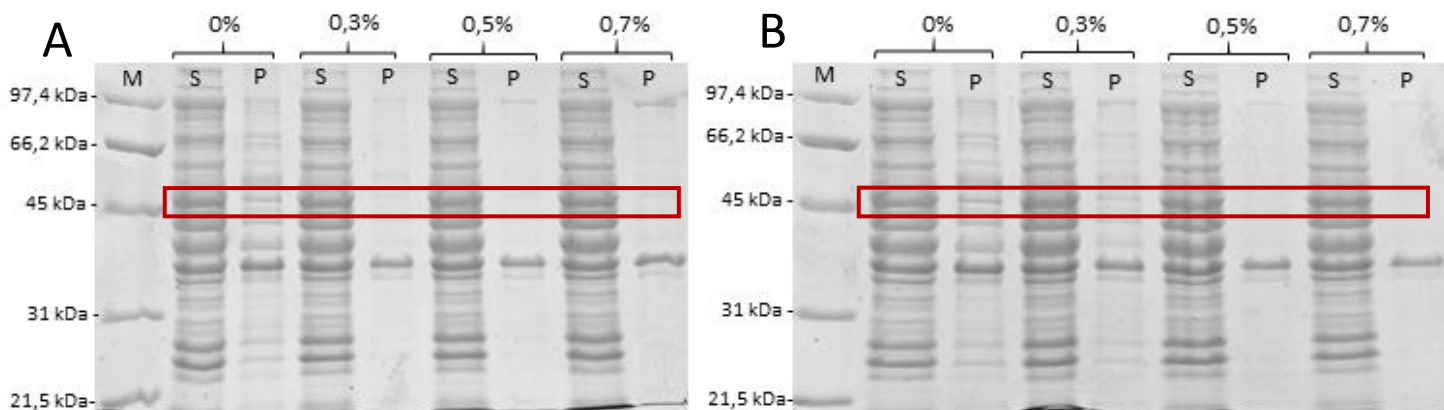


Figura 6: Avaliação da solubilidade da rMhp308D com o uso de diferentes concentrações de sarcosil (A) Linhagem BL21-(DE3)-pLyse transformada com o plasmídeo 1 (B) Linhagem BL21-(DE3)-pLyse transformada com o plasmídeo 2 (M) marcador de massa molecular (S) sobrenadante (P) precipitado celular. Porcentagens se referem à concentração de sarcosil 30% adicionada aos extratos. As bandas em destaque correspondem à rMhp308D presente nas amostras de sobrenadante e precipitado celular.

6. CONCLUSÕES

A partir da análise comparativa entre os repertórios de proteínas secretadas solúveis de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, a proteína não caracterizada Mhp308 foi selecionada como alvo do presente estudo devido à predição de um domínio de ligação à matriz extracelular em sua sequência. Análises *in silico* demonstraram a conservação do domínio predito entre outras espécies patogênicas de micoplasmas bem como a presença de epítomos antigênicos em sua sequência. Uma região da CDS da Mhp308 incluindo o domínio predito foi amplificada por PCR utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos e a mesma foi digerida enzimaticamente de forma a permitir sua clonagem em um vetor de expressão plasmidial através de reação de ligação mediada pela enzima DNA ligase de T4. A clonagem foi confirmada através de PCR de colônia e ensaio de digestão enzimática e plasmídeos recombinantes foram selecionados para uso nas etapas de transformação e expressão da rMhp308D. A otimização da expressão e das condições de solubilização de rMhp308D foi realizada através do teste de diferentes linhagens de *E. coli* BL21-(DE3) para sua produção e da variação na concentração de sarcosil adicionada aos extratos bacterianos.

7. PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao projeto, a próxima etapa incluirá a expressão em maior escala de rMhp308D e a padronização da sua purificação através de cromatografia de afinidade. Paralelamente, será realizado o sequenciamento dos três clones utilizados no teste inicial de expressão de forma a confirmar a clonagem da sequência correta e em fase. A proteína recombinante purificada terá sua antigenicidade avaliada através de ELISA utilizando soro de suínos infectados experimentalmente com *M. hyopneumoniae*. Futuramente, será realizada a avaliação da capacidade da rMhp308D de se ligar ao plasminogênio através de *far-western*. Além disso, como uma perspectiva futura, a mesma poderá ser utilizada em ensaios de imunização de camundongos visando à avaliação da sua imunogenicidade com base nas respostas celular e humoral induzidas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amass, S. F., Clark, L. K., van Alstine, W. G., Bowersock, T. L., Murphy, D. A., Knox, K. E. and Albregts, S. R. (1994) 'Interaction of Mycoplasma hyopneumoniae and Pasteurella multocida infections in swine', *J Am Vet Med Assoc*, 204(1), pp. 102-7.
- Baseman, J. B., Lange, M., Criscimagna, N. L., Giron, J. A. and Thomas, C. A. (1995) 'Interplay between mycoplasmas and host target cells', *Microb Pathog*, 19(2), pp. 105-16.
- Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausbøll, A. and Brunak, S. (2005) 'Non-classical protein secretion in bacteria', *BMC Microbiol*, 5, pp. 58.
- Bhattacharya, S., Ploplis, V. A. and Castellino, F. J. (2012) 'Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination', *J Biomed Biotechnol*, 2012, pp. 482096.
- Burch, D. G. S. (2004) 'The comparative efficacy of antimicrobials for the prevention and treatment of enzootic pneumonia pneumonia and some of their pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships', *The Pig Journal*, 53, pp. 8-27.
- 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. and 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(3), pp. 669-86.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C. and Trigo, A. (1999) 'Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect Mycoplasma hyopneumoniae from nasal swabs', *J Vet Diagn Invest*, 11(3), pp. 246-51.
- Casadevall, A. and Pirofski, L. (2001) 'Host-pathogen interactions: the attributes of virulence', *J Infect Dis*, 184(3), pp. 337-44.
- Casadevall, A. and Pirofski, L. A. (2000) 'Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease', *Infect Immun*, 68(12), pp. 6511-8.
- Chae, C. (2016) 'Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and Mycoplasma hyopneumoniae', *Vet J*, 212, pp. 1-6.
- Chen, A. Y., Fry, S. R., Daggard, G. E. and Mukkur, T. K. (2008) 'Evaluation of immune response to recombinant protective antigens of Mycoplasma hyopneumoniae delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice', *Vaccine*, 26(34), pp. 4372-8.
- Chen, Y. L., Wang, S. N., Yang, W. J., Chen, Y. J., Lin, H. H. and Shiuan, D. (2003) 'Expression and immunogenicity of Mycoplasma hyopneumoniae heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination', *Infect Immun*, 71(3), pp. 1155-60.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. and Thompson, J. D. (2003) 'Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs', *Nucleic Acids Res*, 31(13), pp. 3497-500.
- Ciprián, A., Cruz, T. A. and de la Garza, M. (1994) 'Mycoplasma hyopneumoniae: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens', *Arch Med Res*, 25(2), pp. 235-9.
- Ciprián, A., Palacios, J. M., Quintanar, D., Batista, L., Colmenares, G., Cruz, T., Romero, A., Schnitzlein, W. and Mendoza, S. (2012) 'Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of Mycoplasma hyopneumoniae experimental infection in swine in México', *Res Vet Sci*, 92(2), pp. 191-6.
- Citti, C. and Blanchard, A. (2013) 'Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens', *Trends Microbiol*, 21(4), pp. 196-203.
- Citti, C., Nouvel, L. X. and Baranowski, E. (2010) 'Phase and antigenic variation in mycoplasmas', *Future Microbiol*, 5(7), pp. 1073-85.
- DeBey, M. C., Jacobson, C. D. and Ross, R. F. (1992) 'Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with Mycoplasma hyopneumoniae', *Am J Vet Res*, 53(9), pp. 1705-10.
- DeBey, M. C. and Ross, R. F. (1994) 'Ciliostasis and loss of cilia induced by Mycoplasma hyopneumoniae in porcine tracheal organ cultures', *Infect Immun*, 62(12), pp. 5312-8.
- Deutscher, A. T., Jenkins, C., Minion, F. C., Seymour, L. M., Padula, M. P., Dixon, N. E., Walker, M. J. and 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(2), pp. 444-58.

- Deutscher, A. T., Tacchi, J. L., Minion, F. C., Padula, M. P., Crossett, B., Bogema, D. R., Jenkins, C., Kuit, T. A., Walker, M. J. and Djordjevic, S. P. (2012) 'Mycoplasma hyopneumoniae Surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs', *J Proteome Res*, 11(3), pp. 1924-36.
- Djordjevic, S. P., Cordwell, S. J., Djordjevic, M. A., Wilton, J. and Minion, F. C. (2004) 'Proteolytic processing of the Mycoplasma hyopneumoniae cilium adhesin', *Infect Immun*, 72(5), pp. 2791-802.
- Doytchinova, I. A. and Flower, D. R. (2007) 'VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines', *BMC Bioinformatics*, 8, pp. 4.
- El-Manzalawy, Y., Dobbs, D. and Honavar, V. (2008) 'Predicting linear B-cell epitopes using string kernels', *J Mol Recognit*, 21(4), pp. 243-55.
- Erlanson, K. R., Evans, R. B., Thacker, B. J., Wegner, M. W. and Thacker, E. L. (2005) 'Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for Mycoplasma hyopneumoniae', *Journal of Swine Health and Production*, 13(4), pp. 198-203.
- Fadiel, A., Eichenbaum, K. D., El Semary, N. and Epperson, B. (2007) 'Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution', *Front Biosci*, 12, pp. 2020-8.
- Fagan, P. K., Walker, M. J., Chin, J., Eamens, G. J. and Djordjevic, S. P. (2001) 'Oral immunization of swine with attenuated Salmonella typhimurium aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of Mycoplasma hyopneumoniae (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs', *Microb Pathog*, 30(2), pp. 101-10.
- Feld, N. C., Qvist, P., Ahrens, P., Friis, N. F. and Meyling, A. (1992) 'A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to Mycoplasma hyopneumoniae', *Vet Microbiol*, 30(1), pp. 35-46.
- Ferreira, H. B. and Castro, L. A. d. (2007) 'A preliminary survey of M. hyopneumoniae virulence factors based on comparative genomic analysis', *Genetics and Molecular Biology*, 30, pp. 245-255.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J. and Bateman, A. (2016) 'The Pfam protein families database: towards a more sustainable future', *Nucleic Acids Res*, 44(D1), pp. D279-85.
- Garcia-Morante, B., Segalés, J., Fraile, L., Pérez de Rozas, A., Maiti, H., Coll, T. and Sibila, M. (2016) 'Assessment of Mycoplasma hyopneumoniae-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: a Comparative Review', *J Comp Pathol*, 154(2-3), pp. 125-34.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L. J., von Mering, C. and Bork, P. (2016) 'eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences', *Nucleic Acids Res*, 44(D1), pp. D286-93.
- Inamoto, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Nakai, Y. and Ogimoto, K. (1994) 'Antibiotic susceptibility of Mycoplasma hyopneumoniae isolated from swine', *J Vet Med Sci*, 56(2), pp. 393-4.
- Iriarte, A., Baraibar, J. D., Romero, H. and Musto, H. (2011) 'Selected codon usage bias in members of the class Mollicutes', *Gene*, 473(2), pp. 110-8.
- Jarocki, V. M., Santos, J., Tacchi, J. L., Raymond, B. B., Deutscher, A. T., Jenkins, C., Padula, M. P. and Djordjevic, S. P. (2015) 'MHJ_0461 is a multifunctional leucine aminopeptidase on the surface of Mycoplasma hyopneumoniae', *Open Biol*, 5(1), pp. 140175.
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. and Marcatili, P. (2017) 'BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes', *Nucleic Acids Res*.
- Jorge, S., de Oliveira, N. R., Marchioro, S. B., Fisch, A., Gomes, C. K., Hartleben, C. P., Conceição, F. R. and 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(4), pp. 229-36.
- King, K. W., Faulds, D. H., Rosey, E. L. and Yancey, R. J. (1997) 'Characterization of the gene encoding Mhp1 from Mycoplasma hyopneumoniae and examination of Mhp1's vaccine potential', *Vaccine*, 15(1), pp. 25-35.
- Kolaskar, A. S. and Tongaonkar, P. C. (1990) 'A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens', *FEBS Lett*, 276(1-2), pp. 172-4.
- Käll, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E. L. (2004) 'A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method', *J Mol Biol*, 338(5), pp. 1027-36.
- Leal, F. M., Virginio, V. G., Martello, C. L., Paes, J. A., Borges, T. J., Jaeger, N., Bonorino, C. and Ferreira, H. B. (2016) 'Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare differential domains from

- orthologous surface proteins induce distinct cellular immune responses in mice', *Vet Microbiol*, 190, pp. 50-7.
- Li, Y. Z., Ho, Y. P., Chen, S. T., Chiou, T. W., Li, Z. S. and Shiuan, D. (2009) 'Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*', *Biochemistry (Mosc)*, 74(2), pp. 215-20.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G. and Xiao, S. (2011) 'Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168', *J Bacteriol*, 193(4), pp. 1016-7.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M. and Haesebrouck, F. (2008) 'Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs', *Vet Microbiol*, 126(4), pp. 297-309.
- Marchioro, S. B., Fisch, A., Gomes, C. K., Jorge, S., Galli, V., Haesebrouck, F., Maes, D., Dellagostin, O. and 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 LTb', *Vet Microbiol*, 173(1-2), pp. 166-71.
- McGowin, C. L., Ma, L., Jensen, J. S., Mancuso, M. M., Hamasuna, R., Adegboye, D. and Martin, D. H. (2012) 'Draft genome sequences of four axenic *Mycoplasma genitalium* strains isolated from Denmark, Japan, and Australia', *J Bacteriol*, 194(21), pp. 6010-1.
- Mei, J. M., Nourbakhsh, F., Ford, C. W. and Holden, D. W. (1997) 'Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis', *Mol Microbiol*, 26(2), pp. 399-407.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F. and Maes, D. (2006) 'Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations', *Vaccine*, 24(49-50), pp. 7081-6.
- Minion, F. C., Lefkowitz, E. J., Madsen, M. L., Cleary, B. J., Swartzell, S. M. and Mahairas, G. G. (2004) 'The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis', *J Bacteriol*, 186(21), pp. 7123-33.
- Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S. Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P. D. and Finn, R. D. (2015) 'The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years', *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), pp. D213-21.
- Mukherjee, P. and Mani, S. (2013) 'Methodologies to decipher the cell secretome', *Biochim Biophys Acta*, 1834(11), pp. 2226-32.
- Nathues, H., Doehring, S., Woeste, H., Fahrion, A. S., Doherr, M. G. and grosse Beilage, E. (2013) 'Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning', *Acta Vet Scand*, 55, pp. 44.
- Neto, J. C. G., Strait, E. L., Raymond, M. and Minion, F. C. 2014. Antibody Responses of Swine Following Infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*.
- Nicolet, J., Paroz, P. and Bruggmann, S. (1980) 'Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay', *Res Vet Sci*, 29(3), pp. 305-9.
- Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J. and Halbur, P. G. (2004) 'Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2', *Vet Pathol*, 41(6), pp. 624-40.
- Paes, J. A., Lorenzatto, K. R., de Moraes, S. N., Moura, H., Barr, J. R. and Ferreira, H. B. (2017) 'Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis', *J Proteomics*, 154, pp. 69-77.
- Parrish, J. R., Limjindaporn, T., Hines, J. A., Liu, J., Liu, G. and Finley, R. L. (2004) 'High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*', *J Proteome Res*, 3(3), pp. 582-6.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2011) 'SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions', *Nat Methods*, 8(10), pp. 785-6.
- Pinto, P. M., Chemale, G., de Castro, L. A., Costa, A. P., Kich, J. D., Vainstein, M. H., Zaha, A. and Ferreira, H. B. (2007) 'Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins', *Vet Microbiol*, 121(1-2), pp. 83-93.

- Raymond, B. B. and Djordjevic, S. (2015) 'Exploitation of plasmin(ogen) by bacterial pathogens of veterinary significance', *Vet Microbiol*, 178(1-2), pp. 1-13.
- Razin, S. and Hayflick, L. (2010) 'Highlights of mycoplasma research--an historical perspective', *Biologicals*, 38(2), pp. 183-90.
- Razin, S., Yogeve, D. and Naot, Y. (1998) 'Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas', *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), pp. 1094-156.
- Rottem, S. (2003) 'Interaction of mycoplasmas with host cells', *Physiol Rev*, 83(2), pp. 417-32.
- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T. and Hattori, M. (2002) 'The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans', *Nucleic Acids Res*, 30(23), pp. 5293-300.
- 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. and 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(1), pp. 81-94.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F. and Segalés, J. (2009) 'Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection', *Vet J*, 181(3), pp. 221-31.
- Simionatto, S., Marchioro, S. B., Galli, V., Luerce, T. D., Hartwig, D. D., Moreira, A. N. and 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(1), pp. 101-5.
- Simionatto, S., Marchioro, S. B., Maes, D. and Dellagostin, O. A. (2013) '*Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development', *Vet Microbiol*, 165(3-4), pp. 234-42.
- Siqueira, F. M., Gerber, A. L., Guedes, R. L., Almeida, L. G., Schrank, I. S., Vasconcelos, A. T. and Zaha, A. (2014) 'Unravelling the transcriptome profile of the Swine respiratory tract mycoplasmas', *PLoS One*, 9(10), pp. e110327.
- Siqueira, F. M., Thompson, C. E., Virginio, V. G., Gonchoroski, T., Reolon, L., Almeida, L. G., da Fonsêca, M. M., de Souza, R., Prosdocimi, F., Schrank, I. S., Ferreira, H. B., de Vasconcelos, A. T. and Zaha, A. (2013) 'New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis', *BMC Genomics*, 14, pp. 175.
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A. and Blanchard, A. (2007) 'Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns', *Res Microbiol*, 158(10), pp. 754-66.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) 'Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase', *Gene*, 67(1), pp. 31-40.
- Sobestiansky, J., Ristow, L. E., Matos, M. P. C. and Barcellos, D. (2007) 'Mycoplasmoses', *Doenças dos suínos: Goiânia: Cãnone Editorial*, pp. 768.
- Stemke, G. W. and Robertson, J. A. (1990) 'The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* based upon ATP-dependent luminometry', *Vet Microbiol*, 24(2), pp. 135-42.
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E. and Pedersen, M. W. (1997) '*Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays', *Vet Microbiol*, 54(1), pp. 23-34.
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B. N., Harris, H. K., Cox, T. C. and Massiah, M. A. (2010) 'Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS', *Biotechniques*, 48(1), pp. 61-4.
- Thacker, E. L. (2001) 'Immunology of the porcine respiratory disease complex', *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17(3), pp. 551-65.
- Thacker, E. L. (2004) 'Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*', *Animal Health Research Reviews*, 5(2), pp. 317-320.
- Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R. and Thacker, B. J. (1999) '*Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia', *J Clin Microbiol*, 37(3), pp. 620-7.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Boettcher, T. B. and Jayappa, H. (1998) 'Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins', *Journal of Swine Health and Production*, 6(3), pp. 107-112.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J. and Janke, B. H. (2001) 'Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus', *J Clin Microbiol*, 39(7), pp. 2525-30.

- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Kuhn, M., Hawkins, P. A. and Waters, W. R. (2000) 'Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs', *Am J Vet Res*, 61(11), pp. 1384-9.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J. and Wolff, T. (2006) 'Efficacy of a chlortetracycline feed additive in reducing pneumonia and clinical signs induced by experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge', *Journal of Swine Health and Production*, 14(3), pp. 140-144.
- 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., Seunarez, 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. and 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(16), pp. 5568-77.
- Verhamme, I. M., Panizzi, P. R. and Bock, P. E. (2015) 'Pathogen activators of plasminogen', *J Thromb Haemost*, 13 Suppl 1, pp. S106-14.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A. and Haesebrouck, F. (2004) 'In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates', *Antimicrob Agents Chemother*, 48(11), pp. 4470-2.
- Villarreal, I., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Maes, D. (2012) 'Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains', *BMC Vet Res*, 8, pp. 2.
- Virginio, V. G., Gonchoroski, T., Paes, J. A., Schuck, D. C., Zaha, A. and 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(44), pp. 5832-8.
- Wassenaar, T. M. and Gastra, W. (2001) 'Bacterial virulence: can we draw the line?', *FEMS Microbiol Lett*, 201(1), pp. 1-7.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. and Olins, P. O. (1996) 'Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*', *Curr Opin Biotechnol*, 7(5), pp. 494-9.
- 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. and Djordjevic, S. P. (2009) 'Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*', *Mol Microbiol*, 71(3), pp. 566-82.
- Wolf, M., Müller, T., Dandekar, T. and Pollack, J. D. (2004) '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), pp. 871-5.
- Woolley, L. K., Fell, S. A., Gonsalves, J. R., Raymond, B. B., Collins, D., Kuit, T. A., Walker, M. J., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J. and Jenkins, C. (2014) 'Evaluation of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs', *Vaccine*, 32(34), pp. 4333-41.
- Wu, C. C., Shryock, T. R., Lin, T. L. and Veenhuizen, M. F. (1997) 'Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro', *Swine Health and Production*, 5(6), pp. 227-230.
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J. and Brinkman, F. S. (2010) 'PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes', *Bioinformatics*, 26(13), pp. 1608-15.
- Zhang, Q., Young, T. F. and Ross, R. F. (1995) 'Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin', *Infect Immun*, 63(3), pp. 1013-9.

Zielinski, G. C. and Ross, R. F. (1993) 'Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells', *Am J Vet Res*, 54(8), pp. 1262-9.

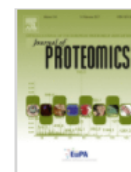
9. APÊNDICE

O principal objetivo deste artigo consistia em realizar uma análise comparativa entre os secretomas solúveis de *M. hyopneumoniae* (patogênica) e *M. flocculare* (comensal), uma vez que diferenças qualitativas entre os repertórios de proteínas secretadas para o meio extracelular podem estar relacionadas com a patogenicidade. A minha participação no projeto se deu inicialmente na etapa de enriquecimento das amostras com proteínas provenientes dos sobrenadantes de cultura em relação ao *background* gerado pelas proteínas do soro fetal utilizado como componente do meio de cultura para micoplasmas (Friis). Este enriquecimento, visando principalmente a redução da concentração de albumina do soro, foi realizado através de diálise contra uma solução de acetato de sódio utilizando tubos de diálise Snake Skin (Thermo Scientific). Em sequência, participei da etapa de preparação e tratamento das amostras de proteínas separadas por SDS-PAGE para envio para identificação através de espectrometria de massas. Após o recebimento dos dados brutos da espectrometria de massas e seu posterior processamento, atuei nas análises *in silico* das proteínas identificadas realizando a predição da localização subcelular, domínios transmembrana, domínios funcionais, presença de peptídeo sinal, via de secreção, existência de órtologos e nível de conservação taxonômica.



Journal of Proteomics

Volume 154, 10 February 2017, Pages 69–77



Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis

Jéssica A. Paes^a, Karina R. Lorenzatto^a, Sofia N. de Moraes^a, Hercules Moura^b, John R. Barr^b, Henrique B. Ferreira^a.  

 [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.002>

[Get rights and content](#)