

INTRODUÇÃO GERAL

Há aproximadamente três anos, iniciei como estagiária de Iniciação Científica no Laboratório de Biologia Molecular onde um grupo bem consolidado já trabalhava na execução do projeto “Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para utilização em imunodiagnóstico e vacinação”. Este projeto faz parte do Projeto Genoma Sul que teve seu início em 2001, com o seqüenciamento do genoma de duas cepas de *M. hyopneumoniae*, um isolado de campo patogênico (7448) e outra cepa referência (J) (VASCONCELOS et al., 2005). Neste projeto, realizei os quatro estágios supervisionados exigidos na grade curricular para formação de Bacharel em Ciências Biológicas. Neste período aprendi a desenvolver várias técnicas de Biologia Molecular, entre elas as que originaram este trabalho de conclusão de curso e outras tantas que contribuíram para a minha formação. Além disso, a experiência adquirida me proporciona suporte para seguir a vida acadêmica e científica nesta área. Este trabalho teve como objetivo a clonagem de três genes de *M. hyopneumoniae*, expressão, purificação e avaliação da antigenicidade das proteínas codificadas por estes genes. Os resultados estão apresentados na forma de um artigo, uma vez que a intenção é submetê-lo a um periódico após a realização de testes complementares para avaliar a imunogenicidade destas proteínas recombinantes, cujo término está previsto para o início do próximo ano. Cabe ressaltar que os resultados descritos aqui neste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foram encaminhados ao XVII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas neste ano de 2008 e este, foi agraciado com o segundo lugar na área de Ciências Biológicas. Apesar de algumas dificuldades inerentes à pesquisa científica, foram obtidos resultados interessantes a partir deste trabalho os quais estão sendo referenciados para testes de imunogenicidade em modelos experimentais. Os dados gerados neste TCC contribuirão para eleger os antígenos mais promissores, os quais serão utilizados em um ensaio de imunoproteção em suínos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características gerais

O gênero *Mycoplasma* pertence à Classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales e família Mycoplasmataceae. A nomenclatura é relacionada à ausência de parede celular e do peptidoglicano (WALKER, 2003). Esta característica estrutural proporciona um extremo pleomorfismo às células de micoplasmas, podendo variar de esférico a bacilar e de filamentososo a helicoidal. O diâmetro da forma esférica varia de 0,3 a 0,8 μm e possui uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana (ROSS, 1999). Os micoplasmas infectam células de uma grande variedade de organismos vivos, incluindo humanos, plantas e animais (RAZIN et al., 1998).

Os micoplasmas evoluíram de bactérias Gram positivas, especialmente no que diz respeito àquelas bactérias com DNA contendo baixo conteúdo G+C. Os mesmos compartilham um ancestral comum com *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Filogeneticamente, a classe Mollicutes é relacionada aos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (DYBVIK e VOELKER, 1996). Os micoplasmas são os menores microrganismos autoreplicantes de vida livre conhecidos e possuem genomas pequenos (580 a 1350 kb) com alto conteúdo de A+T (aproximadamente 70%). A dinâmica evolucionária destes organismos levou ao acúmulo de mutações deletérias que resultaram na redução do genoma que ocorreu como uma consequência da complementaridade metabólica de seus hospedeiros. Uma consequência deste processo foi a preservação de um genoma mínimo compreendendo apenas genes essenciais para manter funções básicas e adaptação a ambientes específicos (VAN HAM et al., 2003). Por este motivo, apresentam capacidades biossintéticas reduzidas, necessitando obter muitos nutrientes de seus hospedeiros, motivo este que torna fastidioso o cultivo *in vitro* destes microrganismos (RAZIN et al., 1998).

O *M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória crônica muito freqüente no setor suinícola. É um microrganismo fastidioso, cresce lentamente em meio de cultivo Friis enriquecido com soro suíno (FRIIS, 1975) e seu isolamento é dificultoso devido à freqüente

contaminação de outros micoplasmas como o *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma flocculare* (ROSS, 1999). Estas características encarecem a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), utilizadas no controle da PES. Quando cultivado, não produz turbidez no meio de cultivo. Por este motivo, são utilizados métodos alternativos para mensurar o crescimento, os quais incluem a incorporação de substratos como a glucose, arginina ou uréia que são fermentados ou hidrolisados pelo *M. hyopneumoniae*, tornando o meio de cultivo ácido ou alcalino. Estas mudanças de pH são usualmente detectadas através da adição ao meio de cultivo do indicador de pH vermelho de fenol (HANNAN, 2000). As células deste microrganismo são visualizadas através das colorações de Giemsa, Casteñeda, Dienes e azul de metileno (ROSS, 1999).

A natureza fastidiosa do *M. hyopneumoniae* e a falta de sistemas genéticos para entender as suas estruturas e funções, têm dificultado o entendimento da sua biologia. Estudos sugerem que *M. hyopneumoniae* apresenta alta heterogeneidade em nível de DNA (KOKOTOVIC et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2005; STAKENBORG et al., 2005, 2006). A tipagem gênica com base no gene p146 mostrou considerável variabilidade genética entre isolados de *M. hyopneumoniae*: mais de 60 % de variabilidade utilizando Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE), 50 % para Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD), 30 % para Comprimento do Fragmento Polimórfico Amplificado (AFLP), e 45 % para Reação em Cadeia da Polimerase acoplado à Restrição do Comprimento do Fragmento Polimórfico (PCR-RFLP) (STAKENBORG et al., 2005, 2006).

Em nível antigênico e proteômico, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot* foram utilizados para estudar a variabilidade entre diferentes isolados de *M. hyopneumoniae*. Foi demonstrada variabilidade intra-espécies utilizando anticorpos diretamente contra a adesina P97 (ZHANG et al., 1995; ASSUNÇÃO et al., 2005), a lactato desidrogenase P36 (ASSUNÇÃO et al., 2005), a proteína de fase aquosa P82, a lipoproteína de superfície P65 (KIN et al., 1990), a proteína de membrana integral P70 (WISE e KIM, 1987) e a proteína de membrana de 43 kDa (SCARMAN et al., 1997). Usando SDS-PAGE, o estudo realizado por Calus et al. (2007) demonstrou a existência de alta heterogeneidade proteômica entre isolados de *M. hyopneumoniae* de diferentes rebanhos. Foi detectado mais de 30% de variabilidade. Estes resultados contrastam com os encontrados por Scarman et al. (1997) que, utilizando SDS-PAGE para comparar o proteoma total de seis

cepas de diferentes regiões geográficas observou que cinco cepas produziram perfis protéicos e antigênicos similares. Da mesma forma, Assunção et al. (2005) comparou 18 isolados de campo de *M. hyopneumoniae* originados de Grã Canária e a cepa referência J e observou um padrão homogêneo em SDS-PAGE. Porém, em análise de *Imunoblot*, estes autores demonstraram alguma heterogeneidade antigênica nas diferentes cepas usando anti-soro contra a cepa J.

Em estudo utilizando modelo experimental de infecção, sugeriu-se a presença de isolados de *M. hyopneumoniae* apresentando variabilidade na virulência. Estes isolados foram classificados como altamente, moderadamente e pouco virulentos baseados em parâmetros incluindo níveis da doença respiratória, níveis de lesões pulmonares e histopatologia (VICCA et al., 2003).

Vários mecanismos têm sido descritos buscando compreender esta variabilidade apresentada por *M. hyopneumoniae*. A presença de número variável de aminoácidos repetidos em tandem (VNTAR) (VASCONCELOS et al., 2005) e de processamento proteolítico pós-traducionais, como o que ocorre com as proteínas P97 (DJORDJEVIC et al., 2004) e P159 (BURNETT et al., 2006). Além disso, a análise minuciosa do genoma de três cepas de *M. hyopneumoniae* 232 (MINION et al., 2004), 7448 e J (VASCONCELOS et al., 2005) revelou a presença de um provável elemento integrativo conjugativo (ICE) presente nas duas cepas patogênicas (7448 e 232) e ausente na cepa não patogênica (J). Os resultados sugerem que o ICE é um DNA móvel e provavelmente envolvido em eventos de recombinação genética e na patogenicidade deste microrganismo (PINTO et al., 2007).

O *M. hyopneumoniae* não utiliza o código genético universal (RAZIN et al., 1998). Esta diferença tem impedido a expressão de genes de *M. hyopneumoniae* contendo códons TGA em *Escherichia coli*, o sistema de expressão heterólogo mais utilizado em laboratório.

2. Patogenia

O *M. hyopneumoniae* apresenta estreita especificidade quanto ao hospedeiro, infectando uma única espécie, a suína, onde causa a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) (RAZIN et al., 1998). A colonização do hospedeiro pelo *M. hyopneumoniae* é feita através da sua aderência aos cílios do epitélio ciliado respiratório. Este microrganismo ataca primeiramente o epitélio ciliado da traquéia, brônquios e

bronquíolos, e subsequentemente causa ciliostase e perda da função dos cílios. Desta forma, aumenta a suscetibilidade do animal a infecções secundárias (THACKER et al., 1999; RAZIN et al., 1998; BLANCHARD et al., 1992; CIPRIAN et al., 1988). A indução à perda dos cílios possivelmente ocorre devido ao aumento da concentração intracelular de cálcio livre nas células do epitélio ciliado (PARK et al., 2002). Danos nas células epiteliais também podem ser causados por toxicidade moderada de produtos do metabolismo, como o peróxido de hidrogênio e radicais de superóxido (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

A adesão deste microrganismo ao epitélio ciliado ocorre por um processo complexo e multifatorial, sendo mediada por uma adesina designada P97 que possui em sua estrutura uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos localizada na porção C terminal da proteína, referida como região R1, que é altamente imunogênica (ZHANG et al., 1994; ZHANG et al., 1995, HSU e MINION, 1996). Esta proteína apresenta pelo menos dois domínios de ligação à heparina, uma glicosaminoglicana. Esta propriedade de ligar-se a glicosaminoglicanas pode estar relacionada à capacidade da bactéria patogênica invadir o sistema imune hospedeiro e modular a resposta inflamatória através da interação com quimiocinas e citocinas do hospedeiro. Portanto, proteínas ligantes de glicosaminoglicanas possivelmente apresentem importante papel no processo infeccioso (JENKINS et al., 2006). Uma outra proteína, a P159, clivada pós-traducionalmente em proteínas de 27, 51 e 110 kDa, também apresenta pelo menos dois domínios de ligação à heparina, o que pode influenciar na interação do microrganismo com o hospedeiro (BURNET et al., 2006). Duas outras proteínas de 28,5 e 54 kDa aparentemente competem pela ligação deste agente aos cílios (CHEN et al., 1992). Outras proteínas deste microrganismo, incluindo a lactato desidrogenase de 36 kDa (HALDIMANN et al., 1993) e lipoproteínas de membrana (WISE e KIM, 1987) foram caracterizados por diferentes grupos de pesquisa, no entanto, a função biológica destas proteínas na patogênese do *M. hyopneumoniae* não foi determinada.

Além destes estudos, a análise de *microarray* revelou que os genes correspondentes às proteínas NrdF e p146 apresentam níveis de transcrição aumentados em resposta ao crescimento de *M. hyopneumoniae* em meio de cultivo suplementado com norepinefrina. Este resultado pode indicar que estas proteínas estejam envolvidas em mecanismos de proteção da bactéria contra estresses e, portanto, desempenham alguma função na sua patogênese (ONEAL et al., 2008).

Outro evento importante da patogênese do *M. hyopneumoniae* são fatores mitogênicos para linfócitos, os quais alteram a função dos macrófagos alveolares e causam imunossupressão (ROSS, 1999). Este microrganismo é capaz de ativar a mitose de linfócitos B e T, escapando das defesas naturais do hospedeiro fixando-se firmemente à mucosa respiratória (RAZIN, 1998).

Durante o processo infeccioso, o *M. hyopneumoniae* estimula a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, as quais são, possivelmente, as principais responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide (RODRIGUEZ et al., 2004). Células RAW 264.7 infectadas experimentalmente com *M. hyopneumoniae* intacto induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) em fluidos do lavado traqueal e bronquioalveolar (HWANG et al, 2008).

Várias citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-8, IL-18 e TNF- α foram detectadas no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico obtido de suínos gnotobiótico após estimulação com *M. hyopneumoniae* inativado termicamente. IL-1 β , IL-8 e IL-18 também foram detectados em lavado de fluido bronquio-alveolar (BALF) após infecção de suínos gnotobióticos com este microrganismo. Estas citocinas induziram a produção de prostaglandina E2 (PGE2). PGE2 é um modulador de muitos tipos de resposta imune, como a inibição de resposta Th1, o desenvolvimento de linfócitos Th2 e a mudança de classe de imunoglobulinas, assim como a diferenciação celular do plasma. Estes resultados sugerem que PGE2 induzido por IL-1 β , IL-18 e TNF- α de macrófagos ativados podem desempenhar um papel importante na imunomodulação na infecção por *M. hyopneumoniae* (MUNETTA et al., 2008). TNF- α pode apresentar um papel importante na patogênese deste microrganismo, uma vez que a concentração de TNF- α aumenta rapidamente na fase aguda da doença, *in vivo* e *in vitro* (THANAWONGNUWECH et al., 2001). A infecção por *M. hyopneumoniae* causa retardo no crescimento dos suínos, o que pode ser causado pelas altas concentrações de TNF- α , uma vez que é conhecido que esta condição é capaz de causar cachexia ou síndrome *Wasting* (MAES et al, 1996). IL-2 e IL-4 expressas em numerosas células mononucleares do tecido-linfóide-associado-aos-brônquios (BALT) podem ser as responsáveis pela hiperplasia linfóide peribronquiolar durante a PES (LIVINGSTON et al., 1972; MAES et al., 1996; SARRADELL et al., 2003). Por outro lado, outras

moléculas, como IL-6 podem desempenhar um papel anti-inflamatório, inibindo, entre outras, a expressão de TNF- α e IL-1 (ADERKA et al., 1989).

A infecção por *M. hyopneumoniae* também suprime a resposta por IFN- γ , causando o aumento de infecções secundárias. A resposta IL-10 específica contra *M. hyopneumoniae* também é suprimida durante a progressão da doença, o que pode levar à ativação de macrófagos, uma vez que a IL-10 apresenta atividade anti-macrófago e é um importante regulador da imunidade de mucosa (MUNETTA et al., 2008).

A presença de citocinas inflamatórias, o produto de macrófagos ativados, sugere que fagócitos mononucleares, possivelmente macrófagos alveolares, têm um papel proeminente na iniciação da resposta inflamatória, iniciando logo após a infecção. Estes macrófagos alveolares imediatamente expressam IL-1 e TNF- α em resposta à infecção (BLANCHARD et al., 1992) e estes, por sua vez, ativam células T. Esta resposta imune culmina na formação das lesões. Portanto, a patogênese da PES é dependente não apenas dos danos causados aos cílios diretamente pelo organismo, mas também pelo efeito causado pelas células do sistema imune. Assim, a identificação e caracterização das proteínas de *M. hyopneumoniae* capazes de induzir a produção de citocinas é um passo importante para o entendimento de sua patogênese.

3. Patologia

A PES é caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente, manifesta-se por tosse seca crônica não produtiva e atraso no ganho de peso, gerando alta morbidade e baixa mortalidade (SOBESTIANSKY; BARCELLOS; MORES, 1999). Sinais clínicos como febre, anorexia e dificuldade na respiração podem ocorrer na presença de co-infecção com outros patógenos (THACKER et al., 1999).

Embora animais de todas as idades sejam susceptíveis a infecção por *M. hyopneumoniae*, a doença é comumente observada em animais na fase de crescimento e terminação, sendo pouco freqüente em animais com menos de seis semanas de idade (SIBILA et al., 2008). O período de incubação varia de 10 a 16 dias, sob condições experimentais. Lesões típicas consistem de uma área bem

demarcada da porção crânio-ventral do pulmão, com coloração variando entre preto-avermelhada à violácea ou acinzentada (ROSS, 1999).

M. hyopenumoniae é considerado um patógeno exclusivo do sistema respiratório (MAROIS, 2006). No entanto, já foi isolado de cérebro de suínos infectados (FRIIS, 1974). Mais recentemente, um estudo mostrou que *M. hyopenumoniae* pôde ser re-isolado de rins, fígado, baço e nódulos linfóides de suínos experimentalmente infectados (LE CARROU et al., 2006). Esta disseminação pode ocorrer através da via linfática ou pela passagem através da circulação sanguínea. No entanto, a disseminação deste microrganismo em órgãos internos parece ser transitória e provavelmente não participe no desenvolvimento desta doença (LE CARROU et al., 2006).

Mudanças histológicas durante a fase aguda da infecção com *M. hyopenumoniae* são caracterizadas por perda de cílios respiratórios, exfoliação de células ciliadas e acúmulo de neutrófilos e macrófagos dentro e nos arredores das vias aéreas. No estágio crônico, ocorre hiperplasia linfóide, presença de exudato inflamatório nas vias aéreas, aumento do septo alveolar, acúmulo de linfócitos ao redor de brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos e hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) causando obliteração do lúmen dos bronquíolos e atelectasia nos arredores do alvéolo (RODRIGUEZ et al., 2007; SARRADEL et al., 2003).

4. Prejuízos econômicos

Os métodos de manejo, o uso de medicação e a vacinação têm aliviado os efeitos deletérios da PES com relação à saúde do rebanho e à qualidade das carcaças. Apesar disso, os prejuízos associados à PES permanecem importantes no setor suinícola (THACKER et al., 2006). As perdas econômicas ocorrem, principalmente, devido à redução na taxa de conversão alimentar, no retardo de ganho de peso, no custo elevado das medicações e, em alguns casos, nas altas taxas de mortalidade (SOBESTIANSKY; BARCELOS; MORES, 1999; ROSS, 1999).

A infecção por *M. hyopenumoniae* tem ampla distribuição geográfica e as perdas econômicas decorrentes podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso. Exames realizados em diferentes países indicam que as

lesões sugestivas da doença ocorrem entre 30% e 80% dos suínos abatidos. No Brasil, constatou-se que 100% dos rebanhos examinados estavam afetados e 55% dos suínos apresentaram lesões características na ocasião do abate (SOBESTIANSKY; BARCELOS; MORES, 1999). Além disso, esta doença predispõe os suínos a infecções secundárias oportunistas, intensificando os prejuízos (THACKER et al., 1999).

5. Epidemiologia

O *M. hyopneumoniae* pode ser introduzido no rebanho de duas formas: pela transmissão direta através do contato com secreções do trato respiratório de suínos infectados e, indireta através de aerossóis. Uma vez no rebanho, o agente é transmitido entre os animais através de gotículas geradas por tosse ou espirro, ou se propagar através de contato direto. A infecção disseminada de forma direta pode ocorrer horizontalmente (de um animal infectado para um não infectado) e também verticalmente (das porcas para seus leitões) (SIBILA et al., 2008).

Apesar da transmissão por contato direto de animais infectados subclínicamente para os animais saudáveis ser a principal, a transmissão por aerossóis tem ganhado mais significância (BARGEN, 2004). O risco de um rebanho ser infectado foi intimamente associado com a densidade de suínos e com a distância entre fazendas. Em estudo realizado com desafio experimental com *M. hyopneumoniae* observou-se que a transmissão por contato direto ocorre logo após a detecção do microrganismo na traquéia, imediatamente sete dias após desafio, quando a maioria deles já apresentava lesões pulmonares na necropsia. Além disso, soroconversão foi detectada 28 dias após infecção (MARROIS et al., 2007). Um estudo recente demonstrou que suínos podem tornar-se soronegativos e permanecer infectados até 214 dias após infecção (dpi). Suínos podem ainda ser soropositivos e não ser infectados aos 254 dpi. Lesões pulmonares associadas à infecção com *M. hyopneumoniae* podem desaparecer enquanto os suínos ainda estão colonizados com o patógeno, sendo capazes de infectar outros animais (PIETER et al., 2008).

A transmissão indireta através de fômites tem sido sugerida, mas não é conclusiva. A fonte de infecção mais preocupante ocorre da matriz para a progênie e a transmissão passiva pode ocorrer através de utensílios provenientes de granjas

contaminadas (FANO; PIJOAN; DOES, 2005; SIBILA et al., 2008; MEYNS et al., 2006). O conhecimento das rotas de transmissão de *M. hyopneumoniae* e de outros patógenos associados com a PES é necessário para um controle mais efetivo da doença bem como para o entendimento dos fatores que influenciam a patogênese (SIBILA et al., 2008).

6. Diagnóstico

A investigação e o controle da doença são dependentes de técnicas de diagnóstico apropriadas. Várias metodologias são utilizadas para monitorar infecções por *M. hyopneumoniae*, no entanto, apresentam limitações. Sinais clínicos e lesões podem ser utilizados como uma tentativa para o diagnóstico desta doença, no entanto, exige observação constante dos animais, o que dispende tempo. Além disso, não é específico, uma vez que os sinais clínicos podem estar relacionados a infecções com outros patógenos (SIBILA et al., 2008). A inspeção em abatedouros é frequentemente utilizada para estimar a incidência de PES, porém, as lesões causadas por *M. hyopneumoniae* não são patognomônicas (SIBILA et al., 2008). Desta forma, testes laboratoriais são necessários para um diagnóstico conclusivo (THACKER, 2004). O isolamento a partir de pulmões infectados através de técnicas bacteriológicas é considerado o “padrão ouro” das técnicas de diagnóstico, mas este agente é extremamente difícil de ser isolado devido seu crescimento lento e interferência com outros micoplasmas suínos (SIBILA et al., 2008). Testes sorológicos são comumente utilizados para monitorar o *status* sanitário dos rebanhos. A detecção de anticorpos de *M. hyopneumoniae* pode ser realizada através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), um método automatizado, rápido e barato que fornece informações úteis quanto à presença de anticorpos derivados matematicamente ou adquiridos (SIBILA et al., 2008). Atualmente os mais utilizados são ELISA de bloqueio (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA kit, Oxoid) e dois tipos de ELISA indireto (HerdCheck, IDEXX e Tween 20-ELISA) (THACKER, 2004).

OKADA et al. (2005) utilizou um anticorpo monoclonal anti-P46 e a proteína recombinante P46 em um ELISA duplo-sanduíche. O teste foi específico para *M. hyopneumoniae*, porém é necessário avaliar se o teste é capaz de diferenciar anticorpos induzidos pela vacina de animais infectados naturalmente. Um ELISA indireto utilizando como antígeno a região N-terminal e C-terminal da P97 foi

proposto por Jan e Kim (2007). No entanto, somente a região C-terminal foi considerada adequada para uso como sorodiagnóstico.

O teste de ELISA apresenta alta especificidade, porém baixa sensibilidade. Além disso, como o *M. hyopneumoniae* ataca o epitélio ciliado respiratório, e tem baixa exposição ao sistema imune, a resposta humoral gerada contra a bactéria é variável e a soroconversão é lenta, não sendo detectado em estágios iniciais da infecção através de sorologia. Outra desvantagem desta técnica é a geração de resultados falso-positivos devido à capacidade deste microrganismo de induzir variação antigênica na sua superfície, resultando em resposta humoral variável. Outros fatores que afetam os níveis de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* incluem a vacinação e infecção corrente com PRRSV (Síndrome do vírus respiratório e reprodutivo de suínos) (THACKER, 2004). Além disso, os suínos podem ser colonizados com um número baixo de organismos de *M. hyopneumoniae*, sem gerar uma resposta sorológica detectável (THACKER, 2006). Portanto, cuidados devem ser tomados quanto ao uso da sorologia para determinar a ausência do organismo no rebanho. Quando discrepâncias nos resultados com testes sorológicos são identificados, um teste imunológico de *Western blot* alvejando diferentes antígenos de *M. hyopneumoniae* pode ser utilizado como teste confirmatório (AMERI et al., 2006).

Com o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR), a acurácia na detecção de *M. hyopneumoniae* aumentou significativamente. Vários trabalhos já foram descritos utilizando diferentes variações da técnica, bem como diferentes alvos (VERDIN et al., 2000; CARON et al., 2000; KURTH et al., 2002; DUBOSSON et al., 2004; STAKENBORG et al., 2006; CAI et al., 2007; STRAIT et al., 2008). O tecido pulmonar é o mais utilizado para detecção do organismo por PCR, enquanto que o isolamento é mais variável em amostras coletadas na cavidade nasal. Análise de lavado traqueal por PCR também pode ser utilizado. O uso de PCR para o diagnóstico da infecção natural a partir de *swab* nasal foi descrito como o mais promissor, uma vez que houve correlação entre a detecção do DNA do *M. hyopneumoniae* e a presença de lesões da PES (SIBILA et al., 2004; 2007b).

Nested-PCR usando dois conjuntos de *primers* é visto como a técnica mais sensível para detectar a infecção (SIBILA et al., 2008), mas pode ser problemático por aumentar a contaminação ambiental das amostras. Técnicas para detectar o organismo em tecido fixado usando PCR também estão sendo testadas. PCR em

tempo real baseado em um elemento repetitivo (REP) e no gene codificando um provável transportador ABC também foi testado como teste diagnóstico (MAYOR et al., 2007). Apesar dos avanços alcançados no diagnóstico com PCR, a diversidade genética entre os isolados de *M. hyopneumoniae* tem dificultado a precisão nestas detecções (SIBILA et al., 2008).

A detecção deste microrganismo em tecido pulmonar também pode ser realizada utilizando teste com anticorpo fluorescente (FA), imunohistoquímica (IHC) e Hibridização *in situ* (ISH). Para a FA, faz-se necessário o uso de amostras *post-mortem*, além de ser relativamente demorado, não sendo aconselhável para um diagnóstico rápido. ISH e IHC podem ser realizadas com tecidos fixados em parafina, tornando estas técnicas mais práticas. Anticorpos monoclonais são comumente utilizados para detectar antígenos de *M. hyopneumoniae* em testes FA e IHC, tornando-os específicos. No entanto, se as vias aéreas contendo epitélio ciliado não forem incluídas nas amostras de tecido coletadas para o diagnóstico, nenhum organismo será detectado, levando a resultados falso-negativos. ISH tem sido usada para detectar e localizar especificadamente DNA de *M. hyopneumoniae* em tecido pulmonar fixado em parafina de animais naturalmente e experimentalmente infectados. Esta técnica utiliza uma sonda ligada à digoxigenina alvejando uma seqüência repetitiva do genoma de *M. hyopneumoniae* (THACKER, 2004). Uma sonda de oligonucleotídeos fluorescentes alvejando o DNA ribossomal 16S também tem sido usada para identificação espécie-específica de *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, e *M. hyorhinis* (SIBILA et al., 2008).

Com relação à tipagem de *M. hyopneumoniae*, Stakenborg *et al.* (2006) avaliou diferentes técnicas moleculares. Neste trabalho, concluiu que esta tipagem pode ser facilmente realizada com alto poder discriminatório e alta reprodutibilidade através da análise de restrição do gene altamente variável codificando a lipoproteína P46. No entanto, esta região limitada pode ser insuficiente para visualizar muitos rearranjos genômicos. Desta forma, o trabalho sugere que as técnicas AFLP ou PFGE, apesar de mais laboriosas, são preferíveis. Este estudo permitiu concluir também que a técnica RAPD não apresenta reprodutibilidade nesta avaliação, enquanto que a determinação do número de repetições no gene codificando a proteína P97 deve ser utilizada apenas se outro marcador epidemiológico for utilizado conjuntamente.

Desta forma, fica clara a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais eficiente que possam superar estas dificuldades. O teste ideal seria aquele rápido, barato, capaz de detectar o patógeno no animal, e, portanto apto a fornecer dados para uso na implementação de medidas de controle.

7. Controle

A infecção por *M. hyopneumoniae* é controlada com o uso de antibióticos, manejo e vacinação (ROSS et al., 1986). A melhoria nas práticas de manejo é primordial para o controle da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* e a primeira medida que deve ser tomada (MAES et al., 1999). A produção *all-in, all-out* (AIAO) é provavelmente o fator mais importante no controle da PES, uma vez que esta pode interromper o ciclo de transmissão do patógeno de suínos mais velhos para mais novos (CLARK et al., 1991). Além disso, o sistema AIAO onde os mesmos suínos são movidos como um grupo para os diferentes estágios de produção é preferível, uma vez que misturar os suínos é uma fonte de estresse aos animais e aumenta a probabilidade de transmissão de doenças. Rebanhos de suíno fechados ou sistemas de produção apresentam uma imunidade de rebanho mais estável quando comparado a rebanhos onde os suínos são comprados. No entanto, a busca por suínos com alta qualidade genética obriga os produtores a comprar seus estoques de criação. Nestes casos, é importante avaliar o estado de saúde do rebanho de origem destes animais (MAES et al., 2008).

A diminuição na densidade de animais durante os diferentes estágios de produção mostrou reduzir os níveis de doenças respiratórias. O tamanho do rebanho geralmente é considerado um fator de risco para doenças respiratórias em suínos, devido o alto risco de introdução de patógenos de outros rebanhos, risco de transmissão de *M. hyopneumoniae* entre rebanhos quando o rebanho é grande e efeito de fatores de manejo e ambientais que são relatadas em grandes rebanhos. Métodos de biossegurança como higiene, controle de insetos e roedores, e movimento restrito de pessoas e equipamentos entre animais de diferentes grupos de idade devem ser aplicadas no rebanho (MAES et al., 2008).

Atenção também deve ser direcionada para as condições ambientais, do local onde os animais são acondicionados, como temperatura e circulação de ar

(MAES et al., 2008). A prevenção de outras doenças como as do complexo de doenças respiratórias de suínos (PRDC) também contribuem para o controle da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* (THACKER et al., 1999). Estudos demonstraram que a infecção simultânea por PRDC aumenta significativamente os níveis de anticorpos em resposta ao *M. hyopneumoniae*, enquanto diminui a eficácia das vacinas (THACKER et al., 1999).

Antimicrobianos como tetraciclina e macrolídeos são frequentemente utilizados, porém, essa prática não é a mais eficiente para obter rebanhos livres ou com PES controlada. Outros antimicrobianos potencialmente ativos podem ser utilizados incluindo lincosamidas, pleuromutilinas, fluoroquinolonas, florfenicol, aminoglicosídeos e aminociclitolis. Fluoroquinolonas e aminoglicosídeos têm efeito micoplasmicida. Uma vez que micoplasmas não apresentam parede celular, são insensíveis a β -lactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas (VICCA et al., 2004; MAES et al., 2008). Apesar de terem sido reportadas resistências antimicrobianas de *M. hyopneumoniae* à tetraciclina (INAMOTO et al., 1994), macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas (VICCA et al., 2004), isto não parece constituir um problema para o tratamento de infecções por *M. hyopneumoniae*. Antimicrobianos ou combinação de antimicrobianos que são ativos contra bactérias secundárias que frequentemente causam complicações às infecções por *M. hyopneumoniae* são indicados (VICCA et al., 2004; MAES et al., 2008).

7.1 Vacinas Comerciais

As vacinas disponíveis comercialmente são compostas por células inteiras inativadas de *M. hyopneumoniae* administradas com adjuvantes. Estas preparações são mundialmente utilizadas no controle das infecções causadas por este patógeno. O principal efeito da vacinação inclui diminuição dos sintomas clínicos, redução no tamanho das lesões pulmonares e melhoria no desempenho dos suínos (ganho de peso diário e taxa de conversão alimentar) (MAES et al., 1999).

Apesar de não ter sido elucidado completamente o mecanismo exato de proteção desta vacina, sugere-se que a resposta imune celular e a mediada por anticorpos de mucosa sejam de fundamental importância para o controle desta doença (THACKER et al., 2000). A imunidade mediada por células (IMC) contra *M. hyopneumoniae*, em resposta à vacinação ou desafio, foi mensurada determinando as

respostas proliferativas de linfócitos após estimulação *in vitro* com antígenos específicos de *M. hyopneumoniae*. Os resultados destes estudos indicaram que a resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico foi mais pronunciada em suínos vacinados do que em não vacinados (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1998). Por outro lado, a supressão da resposta de células T por timectomia e tratamento com soro anti-timócito resultou em decréscimo na severidade de lesões microscópicas após desafio, apesar de a multiplicação de *M. hyopneumoniae* ter sido aumentada comparada a suínos imuno-competentes. Este achado sugere que a IMC pode retardar e, ao mesmo tempo, ajudar o desenvolvimento da PES (TAJIMA et al., 1984).

Com relação à imunidade humoral, em estudo realizado por Sibila et al. (2004a), as vacinas comerciais preveniram o aumento da concentração de TNF- α no pulmão em resposta ao desafio com *M. hyopneumoniae* e induziram anticorpos específicos no soro contra este microrganismo. A porcentagem de animais soroconvertendo após vacinação aumentou de 30 para 100%. No entanto, nenhuma correlação direta pode ser demonstrada entre a concentração de anticorpos no soro e a proteção contra o desafio com *M. hyopneumoniae* (Djordjevic et al., 1997; Thacker et al., 1998).

Diferentes estratégias de vacinação têm sido adotadas, dependendo do tipo de rebanho, do sistema de produção, das práticas de manejo, do padrão de infecção e da preferência dos suinocultores. Como a infecção com este microrganismo pode ocorrer já durante as primeiras semanas de vida, (VICCA et al., 2002; SIBILA et al., 2007b) a vacinação de suínos recém nascidos é comumente utilizada, tendo a vantagem de a imunidade poder ser induzida antes do suíno ser infectado, além de haverem menos patógenos que possam interferir na resposta imune. No entanto, pode haver interferência de anticorpos maternos e o risco aumentado de infecções mais severas de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) quando utilizada esta estratégia de vacinação. Vacinação de suínos de maternidade tem menor ou nenhuma interferência com possíveis anticorpos maternos, no entanto, neste momento os animais podem já ter sido infectados com *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2008).

Vacinação de porcas no final da gestação pode ser realizada visando reduzir a possibilidade de infecção da porca para os filhotes e proteger os filhotes via anticorpos maternos (MAES et al., 2008). No entanto, há controvérsias acerca desta proteção. Thacker et al (2000b) sugerem que anticorpos maternos apenas provêm

uma proteção parcial contra o desenvolvimento de lesões após desafio e, sob condições experimentais, eles causam limitado ou nenhum efeito sob a colonização de *M. hyopneumoniae*. Em estudo realizado por Sibila et al (2008), a vacinação de leitões não afetou a colonização deste microrganismo nos filhotes, mas aumentou a porcentagem de filhotes soropositivos no desmame e reduziu significativamente a média de lesões pulmonares no abate. Bandrick et al.,(2008) sugeriu que linfócitos que são transferidos passivamente de porcas vacinadas para seus filhotes através do colostro são capazes de proliferar e participar na resposta imune contra *M. hyopneumoniae*.

Diferentes vias de administração da vacina também tem sido testadas. Vacinação intradérmica com uma bacterina comercial mostrou eficácia em estudo realizado por Jones et al. (2004). Vacinas administradas via aerossóis, seriam uma boa alternativa para o controle desta doença, uma vez que reduziriam substancialmente os custos de vacinação além de serem melhor para o bem-estar dos suínos e serem capaz de estimular resposta imune de mucosa no trato respiratório. No entanto, os estudos realizados com vacinas de aerossol demonstraram proteção insuficiente comparado à aplicação intramuscular (MURPHY et al., 1993). Por outro lado, estudos utilizando vacina oral com micro esferas, baseada na cepa PRIT-5 de *M. hyopneumoniae* e preparada por método utilizando *spray* significativamente reduziu as lesões causadas pela PES após desafio com *M. hyopneumoniae* em suínos (LIN et al. 2003).

Apesar de a vacinação conferir efeitos benéficos na maioria dos rebanhos infectados, os efeitos são variáveis entre rebanhos. Esta variação ocorre devido a diferentes fatores como condições impróprias de estocagem das vacinas e de técnicas de injeção, diferença antigênica entre as cepas de campo e as cepas vacinais, presença da doença no momento da vacinação, e a interferência de resposta imune induzida pela vacina devido a anticorpos do colostro (MAES et al., 2008).

Em rebanhos livres de *M. hyopneumoniae* ou em rebanhos com níveis muito baixos de infecção, a vacinação não deve ser recomendada, pois nestas condições, os benefícios da vacinação não superam os gastos. Em rebanhos com níveis altos de infecção sem sinais clínicos óbvios, ou em rebanhos com doença clínica, a vacinação é economicamente justificável (MAES et al., 2008).

7.2 Desenvolvimento de novas vacinas

Apesar de existirem vacinas comerciais, as mesmas fornecem apenas uma proteção parcial e não previnem a colonização do organismo (THACKER et al., 1998, 2000a). Além disso, as mesmas não são produzidas no Brasil, apresentam elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente (CHEN; LIAO; MAO, 2001) e as cepas de *M. hyopneumoniae* apresentam alta variabilidade, devido a eventos de recombinação que ocorreram evolutivamente, tornando o emprego da vacinação ainda mais dificultoso (MAYOR et al., 2007).

Desta forma, a identificação e caracterização de novos antígenos de *M. hyopneumoniae* representam um passo importante na definição de estratégias alternativas para o controle da PES. Com a seqüência genômica de duas cepas referências de *M. hyopneumoniae* 232 (MINION et al., 2004) e *M. hyopneumoniae* J, e de um isolado de campo patogênico *M. hyopneumoniae* 7448 (VASCONCELOS et al., 2005) disponíveis, torna-se possível a utilização de uma técnica mais racional para identificação de novas proteínas imunogênicas. Ferramentas de bioinformática podem ser utilizadas para prever *in silico* potenciais antígenos. Além disso, esta tem como vantagem identificar proteínas independentemente de sua abundância e sem a necessidade do crescimento do microrganismo *in vitro* (ADU-BOBIE et al., 2003). Os genes selecionados podem ser expressos em sistemas heterólogos, purificados e então serem avaliados quanto ao seu potencial como candidatos vacinais, através de uma técnica denominada vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2001; CAPECCHI et al., 2004). O pequeno genoma (VASCONCELOS et al., 2005) e o limitado número de proteínas secretadas e de superfície de *Mycoplasma hyopneumoniae* favorecem o uso desta técnica (RAPPUOLI, 2001; CAPECCHI et al., 2004).

Com este fim, alguns prováveis antígenos espécie-específicos de *M. hyopneumoniae* têm sido descritos baseados em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e em análise de *Imunoblot* a partir de diferentes cepas de referência e isolados de campo (Assuncao et al., 2005b; Scarman et al., 1997; Strasser et al., 1992), mas as proteínas e genes correspondentes ainda não foram caracterizados com detalhes (MEENS et al., 2006).

Pesquisas com novas abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o desenvolvimento de vacinas mais eficientes no controle da PES, incluindo desde formulações com alimento até vacinas de subunidade e de DNA. A adesina P97 de

M. hyopneumoniae é o antígeno mais estudado e vários trabalhos utilizando diferentes abordagens já foram descritos. Uma vacina de subunidade recombinante baseada na adesina p97 foi testada, no entanto conferiu apenas uma proteção mínima e não significativa em modelo de infecção de desafio em suínos. King et al. (1996).

A imunização de camundongos com a porção recombinante R1 da adesina P97 não induziu anticorpos específicos sistêmicos e de mucosa. No entanto, a imunização com a região R1 fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (rLTBR1) induziu em camundongos, anticorpos sistêmicos anti-R1 e de mucosa (IgA). Quando a imunização foi intra-nasal (IN) a resposta imune induzida foi preferencialmente Th1 e quando a via foi intra-muscular (IM) houve indução de resposta Th2 e de mucosa (CONCEIÇÃO et al., 2006). Quando a região C-terminal da P97 (R1) foi fusionada a toxina A de *Pseudomonas*, camundongos e suínos imunizados com essa vacina de subunidade produziram resposta imune específica composta por IgG contra a R1 (CHEN et al., 2001). Imunização intranasal de suínos com a cepa atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressando a proteína recombinante p97 significativamente reduziu a severidade das lesões de pulmão após desafio. No entanto, aparentemente, não foram observadas significante resposta imune humoral e mediada por células nos suínos imunizados (Shimoji et al., 2003). A imunogenicidade de *Salmonella typhimurium* expressando P97R1 sob o controle de sistema de expressão eucariótico e procarótico também foi investigado em camundongos, porém, nenhuma destas duas estratégias de vacinação induziu anticorpos IgA, IgM ou IgG específicos mensuráveis (CHEN et al., 2006). Um estudo mais recente demonstrou que camundongos imunizados IN com um adenovírus defeituoso expressando a região C-terminal da P97 induziu resposta imune sistêmica Th1/Th2, bem como imunidade local (OKAMBA et al., 2007). A diferença no tipo de imunidade induzida por estes antígenos pode ser influenciada pela diferença na construção vacinal, pela rota de imunização, pelo dobramento correto e/ou outra modificação pós traducional que pode contribuir na habilidade de gerar anticorpos pelo antígeno (PINTO et al., 2007). Estes resultados indicam que o antígeno P97 pode ser protetor se administrado de uma forma que aumente sua imunogenicidade.

A imunização oral com *Salmonella typhimurium* aroA ASL3261 expressando o antígeno recombinante NrdF (ribonucleoside-diphosphate reductase b chain) induziu singinicante IgA específico em pulmões de camundongos, resultou em altas taxas de

ganho de peso diário e reduziu lesões pulmonares em suínos. No entanto, não foi capaz de induzir anticorpos IgM, IgA ou IgG específicos no soro. Quando essa construção foi avaliada em suínos foi capaz de reduzir as lesões pulmonares causadas pela PES (FAGAN et al., 1996, 2001). Por outro lado, esplenócitos de camundongos vacinados com este mesmo antígeno na forma de vacina de DNA mediada por *Salmonella typhimurium* aroA não produzem concentração significativa de IgA, no entanto, produzem níveis significantes de IFN- γ comparado ao grupo controle (estimulado apenas com NrdF). Estes resultados sugerem que uma vacina de DNA mediada por bactéria pode induzir resposta imune celular mais eficientemente do que bactérias expressando antígenos heterólogos (CHEN, et al., 2006).

Além destes estudos, significativa resposta imune com vacinas de DNA foi elucidada em camundongos, baseado na expressão da proteína de choque térmico P42 (Chen et al., 2003). Chen et al., 2008 avaliou a resposta imune gerada através de diferentes estratégias de imunização, utilizando coquetéis de antígenos compostos pelas proteínas P97, P36, P42 e NrdF (C1) e P97R1, P36, P42 e NrdF (C2). A imunização intramuscular destes dois coquetéis na forma de vacinas de DNA revelou a indução de uma resposta preferencialmente do tipo Th1 (IMC) e a indução de anticorpos IgG específicos apenas contra P42. No entanto, quando estes coquetéis foram administrados subcutaneamente na forma de proteínas recombinantes e na forma de proteínas recombinantes juntamente com vacinas de DNA, foram induzidos anticorpos IgG específicos contra todos os antígenos. Surpreendentemente, a imunização com os coquetéis de proteínas recombinantes também induziram uma resposta Th1 pronunciada. Outras proteínas ainda não foram testadas como antígenos vacinais, porém mostraram-se antigênicas em testes preliminares. As lipoproteínas associadas à membrana e altamente conservadas Mhp387 e Mhp651, por exemplo, foram reconhecidas especificadamente por soro de suíno convalescente através das técnicas de ELISA e *Western blot*, indicando que são expressas durante a infecção. Além disso, mostraram ser espécie-específicas em experimento de ELISA utilizando soro de coelho hiperimune, sendo que a proteína Mhp651 apresentou apenas uma reação cruzada mínima com *M. flocculare*. Como estas proteínas são expostas na superfície, elas podem estar envolvidas na patogênese de *M. hyopneumoniae*, portanto, podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de uma vacina (MEENS et al., 2006). A proteína p102, paróloga da

proteína p97, também é expressa durante a infecção, e pode apresentar função similar à da p97, auxiliando no processo de adesão aos cílios (ADAMS et al., 2005).

Estes estudos sugerem que estas abordagens vacinas podem representar uma nova estratégia para o controle da PES. Mas eles precisam ser validados em suínos. Desta forma, a identificação e caracterização imunológica de novos antígenos imunogênicos do *M. hyopneumoniae* irá contribuir para o desenvolvimento de testes sorológicos mais eficientes e de novas vacinas realmente efetivas no controle desta doença. Para isto, o entendimento da patobiologia da infecção por *M. hyopneumoniae* e as bases moleculares de patogenicidade deste microrganismo são necessárias.

8. Conclusão

O controle efetivo da Pneumonia Enzoótica Suína requer a otimização das técnicas de manejo e monitoramento, de diagnóstico e de vacinação. Estudos vêm sendo desenvolvidos buscando novas alternativas para o diagnóstico e profilaxia desta doença, no entanto, o número de antígenos caracterizados até o momento é bastante restrito, e não apresentaram proteção satisfatória. Desta forma, é fundamental que novos antígenos imunogênicos capazes de induzir imunidade protetora sejam identificados, visando o desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra a PES e de testes diagnóstico mais eficientes.

ARTIGO 1

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae***

**GALLI, Vanessa¹; SIMIONATTO, Simone¹; MARCHIORO, Silvana B.¹;
DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹**

¹ Laboratório de Biologia Molecular, CenBiot/UFPel, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

1 INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das doenças respiratórias mais freqüentes na criação de suínos no mundo. Esta doença é caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, piora nas taxas de conversão alimentar e retardo no crescimento dos suínos, causando consideráveis perdas econômicas à produção suína (Sobestiansky et al., 1999; Ross et al., 1986). Este agente coloniza e adere-se ao epitélio ciliado respiratório, comprometendo a sua integridade e tornando-o suscetível a infecções secundárias e oportunistas (Thacker et al., 1999). A PES pode ser controlada com o uso de antibióticos e procedimentos de manejo animal, no entanto, a vacinação é considerada a forma mais eficiente de controle desta infecção (Ross et al., 1986). A vacina disponível comercialmente consiste de células inteiras inativadas (bacterina) e apresenta elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente. Além disso, a mesma apresenta apenas uma proteção parcial contra a PES (Sobestiansky et al., 1999).

Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. Potenciais antígenos vêm sendo testados em diferentes estratégias de vacinação, porém o repertório de antígenos caracterizados até o momento é bastante restrito (Lin et al., 2003; Okamba et al., 2007). Desta forma, a identificação e caracterização imunológica de um número maior de proteínas antigênicas deste agente podem minimizar estas limitações. Os dados gerados com o seqüenciamento e a análise proteômica complementar de duas cepas de *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos et al., 2005), possibilitaram a identificação de seqüências codificadoras (CDS) de proteínas antigênicas e/ou envolvidas na patogenicidade deste agente. Estes dados contribuem para a caracterização de novas proteínas antigênicas, as quais, além de serem úteis para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico e/ou vacinação, podem contribuir para a elucidação dos fatores de virulência e de patogenicidade deste agente (Wassenaar e Gaastra, 2001).

Entretanto, a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em *Escherichia coli* é dificultada uma vez que o código genético do *M. hyopneumoniae* possui o códon TGA codificando para o aminoácido triptofano, enquanto que em *E. coli*, TGA é um códon de terminação (Razin, Yogev; Naot, 1998). A substituição na seqüência do DNA do

códon TGA para TGG, o qual codifica para o aminoácido triptofano em *E. coli*, possibilita a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos. Buscando contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas no controle da PES, este trabalho teve por objetivo a produção e avaliação da antigenicidade de quatro proteínas secretadas de *M. hyopneumoniae*, visando o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra esta doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas e plasmídios

Foram utilizadas *E. coli* TOP10 como cepa de clonagem e *E. coli* BL21(DE3) RIL (Invitrogen) como cepa de expressão. O vetor de expressão pAE foi obtido do Instituto Butantan (Ramos et al., 2004). Este vetor possui o promotor T7 e permite a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de Histidina na porção N-terminal.

2.2 Análise das Regiões Codificadoras (CDS)

As CDS da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (GenBank acesso NC_007332) foram analisadas com o auxílio de programas de bioinformática (PFAM, SWISS-PROT, PROSITE, NNAPREDICT, VECTOR NTI 10), buscando satisfazer características como: possível envolvimento das proteínas codificadas em aspectos relacionados à patogenicidade e/ou à antigenicidade, seqüências hidrofílicas com poucos ou nenhum códon de triptofano. Foram selecionadas quatro CDS as quais codificam para uma paróloga da proteína P102 (MHP0418), uma paróloga da proteína P97 (MHP0107) e duas proteínas hipotéticas (MHP0338 e MHP0660).

2.3 Amplificação dos fragmentos gênicos

Os *primers* utilizados foram desenhados com o auxílio do software Vector NTI 10 (Invitrogen) (Tabela 1). Para realização da clonagem no vetor pAE, um sítio de restrição foi adicionado em cada *primer*. As CDs de *M. hyopneumoniae* foram amplificadas por PCR a partir do DNA cromossomal com o auxílio da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As condições da reação de PCR foram otimizadas conforme segue: volume final de 25 µl contendo 50 ng do DNA genômico de *M.*

hyopneumoniae, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol de cada *primer*, 2 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1x tampão da enzima. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany), utilizando as seguintes condições: 7 min a 95 °C seguido por 30 ciclos de 60' a 95 °C, 60' a 50 °C e 60' a 72 °C e a extensão final de 7 min a 72 °C. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e purificado utilizando GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acordo com as instruções do fabricante (GE Helthcare).

Tabela 1. CDs de *M. hyopneumoniae* selecionados e os respectivos *primers* desenhados para amplificação.

CDs	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
MHP0418	5'CACCGGATCCGTATCAAAAGCAGATCGA3'	5'CCCAAGCTTTTATTGTTTTATATAATTAC TAAT3'
MHP0107	5'CACCGGATCCAAAATAAAAGAAAATTGTTT3'	5'CCGGTACCTCAAGCCCGAACTTT3'
MHP0338	5'CACCGGATCCTATAAAATTTTGACAAAACAA3' 5'TTTGCTTGgGCTTCTCTG3'*	5'GGGTACCCTATCTGCCAATATAAAATC 3' 5'AGAAGCcCAAGCAAAATTG3**
MHP0660	5'CACCGGATCCGAAAATTTAGCGCCATAT3' 5'AGGCATTGgTATTCTTTATTAG3**	5'CCCAAGCTTTCATTTTTTAAGTAAATTG G3' 5'AGAATAcCAATGCCTTTTCAG3**

**Primers* internos desenhados para realizar a mutação sítio-dirigida.

2.4 Mutação Sítio-Dirigida

Os alvos que continham códons TGA foram submetidos à mutagênese sítio-dirigida através da técnica de PCR-*overlapping* modificada conforme segue. Os genes foram amplificados em dois segmentos, tendo o *primer reverse* do primeiro segmento e o *forward* do segundo a seqüência alterada de TGA para TGG, com sobreposição de pelo menos 12 nucleotídeos. Cada um dos segmentos foi amplificado separadamente e purificado. Estes *amplicons* foram utilizados como DNA molde para uma segunda amplificação que, por haver sobreposição das regiões, a *Taq* DNA Polimerase é capaz de incorporar os nucleotídeos havendo a extensão de todo o alvo selecionado. O produto da segunda amplificação foi usado como DNA molde para uma terceira amplificação utilizando os *primers* externos. O produto de cada reação de PCR realizada foi confirmado quanto a sua pureza em gel de agarose 1%. O resultado da mutação foi confirmado através de seqüenciamento, utilizando DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit e um MegaBACE 500 DNA sequencer (GE Healthcare).

2.5 Clonagem dos fragmentos gênicos

Os fragmentos gerados na PCR, bem como os amplicons mutados, foram submetidos à clonagem no vetor de expressão pAE utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto da ligação foi transformado por eletroporação em *E. coli* TOP10. A triagem dos clones recombinantes foi realizada através da técnica microprep (Jouglard et al., 2002). Os plasmídios transformados foram expandidos em caldo Luria-Bertani (LB, Difco) suplementado com 100 µg de ampicilina, seguido de uma extração de DNA plasmidial e caracterização enzimática dos plasmídios recombinantes, utilizando as enzimas *Bam*HI e *Hind*III para as CDS MHP0418 e MHP0660 e as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I para as CDS MHP0107 e MHP0338.

2.6 Expressão e teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Os plasmídios recombinantes foram transformados na cepa de expressão *E. coli* BL21 DE3 RIL competente. Uma colônia de cada plasmídio transformado foi cultivado em LB com ampicilina em agitador orbital a 37°C até OD₆₀₀=0,6. A indução protéica foi realizada com 0,3 mM de isopropylthio-β-D-galactosidase (IPTG, Invitrogen) por 3 h. Após a indução, 1 mL de cultura foi centrifugado a 14000 × g por 2 min e o pellet foi ressuspendido em 80 µl de 0,1 M de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) contendo 20 µl de tampão de corrida 5X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS). Após ferver por 10 min, 8 µl do sobrenadante foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. A expressão das proteínas recombinantes foi visualizada em gel SDS-PAGE corando com Comassie Blue.

Para testar a solubilidade das proteínas recombinantes expressas foi retirado um 1 mL de cultura induzida com IPTG e centrifugado a 14000 × g por 2 min. O precipitado foi ressuspendido em 500 µl de PBS contendo 1 mg/ml de lisozima e 1 mM de PMSF. As células foram lisadas por sonicação (6 × 10 segundos de pulsos) em banho de gelo. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 10,000 × g por 5 min. Ambas as frações foram submetidas a SDS-PAGE 12% para identificação da localização da proteína. As proteínas solúveis permaneceram no sobrenadante e as proteínas insolúveis no precipitado.

2.7 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram expressas em 500 mL e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema automatizado de purificação ÄKTA-Prime (GE Healthcare). A pureza das proteínas recombinantes purificadas foi verificada em SDS-PAGE 12% e as frações puras das mesmas foram solubilizadas em solução contendo 20 mM Na₂HPO₄, 0,5 M NaCl, 2,46 mM Imidazole e 0,2% Lauroyl sarcosine e submetidas a uma diálise em uma solução tampão pH 8,0 contendo 100 mM Tris e 150 mM NaCl para remoção dos sais e promover o dobramento das proteínas. A concentração protéica obtida no final deste processo foi determinada usando o kit BCA™ Protein Assay (Pierce).

2.8 Western blot

A confirmação do tamanho das proteínas recombinantes purificadas foi realizada através de *Western blot*. Para tanto, foram eletrotransferidas duas microgramas de cada proteína para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e bloqueada com leite desnatado 5% em PBS 1x durante 2 h. Após lavar com PBS-T (PBS acrescido de 0,05% de *Tween* 20), a membrana foi incubada a 37°C com anticorpo anti-histidina diluído 1:10000, durante 1h. Em seguida a membrana foi lavada novamente com PBS-T e adicionado o anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase diluído 1:2000, seguida da incubação a 37 °C por 1 h. As bandas das proteínas imunoreativas foram detectadas com 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), Tris-HCl 50 mM e NiSO₄ 0,3%.

2.9 Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas quanto ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através da técnica de *Western blot*. Foram testados dois *pools* de cinco soros de suínos naturalmente infectados com necrópsia positiva para a PES, um *pool* com dois soros de suíno SPF e um *pool* com três soros hiperimunes de suínos (previamente imunizado com *M. hyopneumoniae* cepa patogênica 7448). Para tanto, foram transferidas duas microgramas de proteína purificada para uma membrana de

nitrocelulose (GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% a 4 °C por 2h. Posteriormente, estas membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-T e foram adicionados os soros de suínos diluídos 1:100, incubados a 37 °C por 2h. Visando diminuir reações inespecíficas contra antígenos de *E. coli* os soros de suínos foram adsorvidos previamente em extrato de *E. coli*. Após lavagem com PBS-T, foi adicionado o anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:2000), incubado a 37 °C por 1 h. As bandas das proteínas imunoreativas foram detectadas com DAB, Tris-HCl 50 mM e Ni²⁺SO₄ 0,3%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação e caracterização de novas proteínas antigênicas de *M. hyopenumoniae* representa um passo importante na definição de estratégias alternativas para o controle da PES. O pequeno tamanho e o limitado número de proteínas secretadas e de superfície deste agente favorecem o uso da técnica denominada vacinologia reversa (Rappuoli, 2001; Capecchi et al., 2004). Desta forma, este trabalho teve por objetivo a clonagem de genes de *M. hyopenumoniae* em um vetor de expressão em *E. coli*, expressão, purificação e caracterização antigênica das proteínas recombinantes. Foram selecionadas quatro CDS de *M. hyopenumoniae*: duas codificam para proteínas hipotéticas (MHP0660 e região C-terminal da MHP0338), uma à região C-terminal da proteína p102 (MHP0418) e a outra codifica para a região N-terminal da proteína paróloga à p97 (MHP0107). Esta última pode ter função semelhante à da proteína p97 já caracterizada e responsável pela adesão do *M. hyopenumoniae* ao epitélio ciliado.

M. hyopenumoniae apresenta um genoma com alto conteúdo A+T (DYBVIK e VOELKER, 1996), o que representa certa dificuldade para o desenho de *primers*. Apesar disto, os quatro alvos selecionados foram amplificados por PCR e clonados no vetor pAE. A metodologia adotada para a realização da mutação sítio-dirigida foi eficiente uma vez que os dois alvos selecionados (MHP0660 e MHP0338) e submetidos à mutação tiveram a substituição do códon TGA por TGG, resultado confirmado por seqüenciamento. A Figura 1 demonstra o resultado de um dos alvos mutados por PCR.

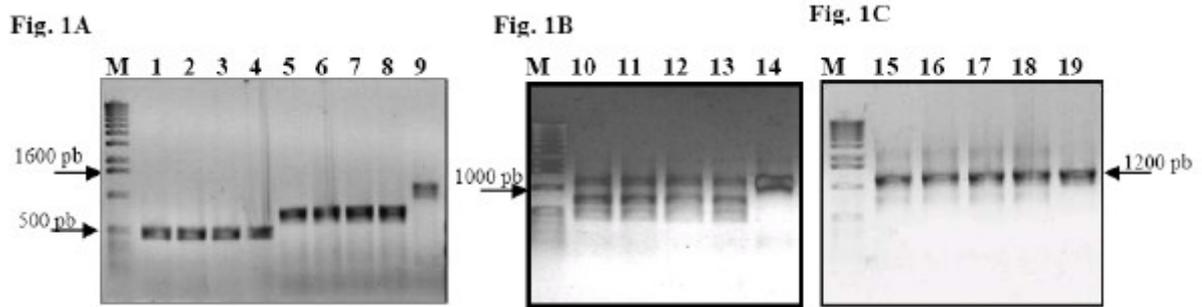


Fig. 1. Eletroforese em gel de agarose 1 % da mutação sítio-dirigida da CDS MHP0660. 1A: produtos gênicos gerados na primeira etapa de PCR. Coluna M, marcador de DNA 1 kb; Colunas 1-4, produto da PCR obtido com *primers forward* externo e *reverse* mutado; Colunas 5-8, produto da PCR obtido com *primers reverse* externo e *forward* mutado. 1B: Colunas 10-13, produtos gênicos obtidos a partir da segunda etapa de PCR, onde os produtos gênicos da primeira etapa de PCR foram unidos para extensão de todo o fragmento. 1C: Colunas 15-18, produto de PCR obtido a partir da amplificação usando DNA genômico de *M. hyopneumoniae* e *primers* externos, usado como controle positivo.

Três plasmídios recombinantes foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) RIL e as respectivas proteínas expressas. A Figura 2 demonstra o resultado obtido com a expressão destas proteínas.

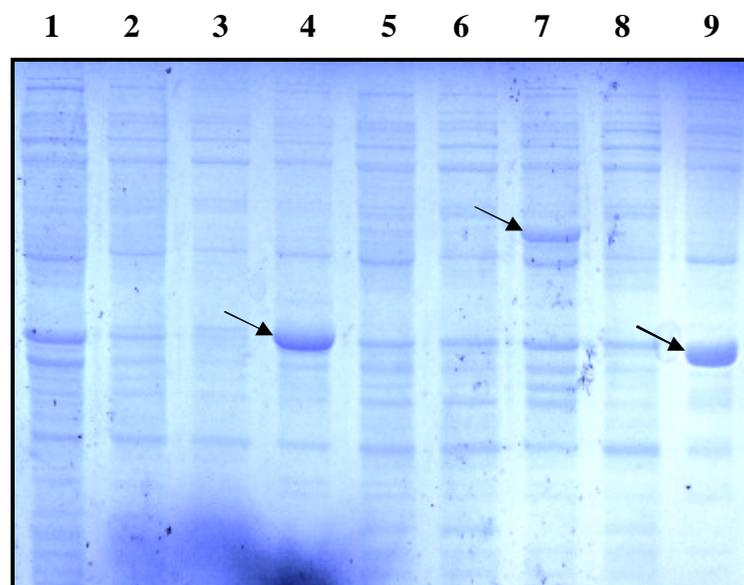


Fig. 2. SDS-PAGE 12 % da expressão de três proteínas de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli* BL21(DE3)RIL. Coluna 1, *E. coli* BL21(DE3)RIL; Coluna 2, MHP0418 amostra não-induzida; Coluna 3, MHP0418 amostra solúvel; Coluna 4, MHP0418 amostra insolúvel; Coluna 5, MHP0107 amostra não-induzida; Coluna 6, MHP0107 amostra solúvel; Coluna 7, MHP0107 amostra insolúvel; Coluna 8, MHP0660 amostra solúvel; Coluna 9, MHP0660 amostra insolúvel. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes expressas em *E. coli* BL21(DE3)RIL.

As proteínas recombinantes que estavam sendo expressas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel, em concentrações suficientes para uma posterior avaliação antigênica e imunogênica. As proteínas foram expressas insolúveis em *E. coli*, apesar do fato de terem sido selecionadas regiões hidrofílicas durante a análise *in silico*. A solubilização das mesmas foi realizada em 8M uréia. As proteínas recombinantes purificadas foram submetidas a um *Western blot* com anticorpo anti-histidina, uma vez que a estratégia de purificação utilizada exigia a fusão de seis histidinas na porção N-terminal da proteína purificada. Esta técnica permitiu confirmar a identidade e o tamanho das três proteínas purificadas. A Figura 3 demonstra um SDS-PAGE 12% com as três proteínas purificadas e *Western blot* anti-histidina.

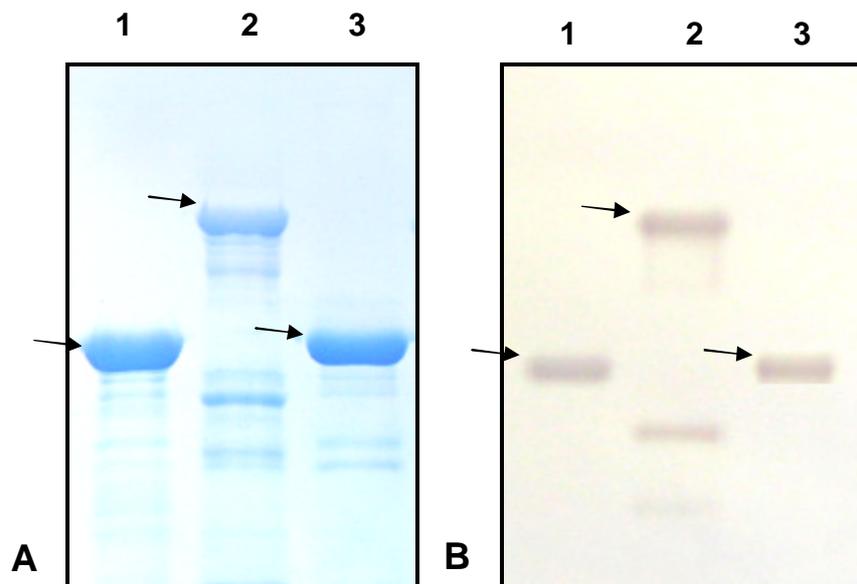


Figura 3. **A.** 12% SDS-PAGE das três proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade. **B.** *Western blot* das três proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas contra anticorpo anti-histidina (diluído 1:10.000) e anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase (diluído 1:2000) utilizando anticorpo anti-histidina. Coluna 1, MHP0418 (38 kDa); Coluna 2, MHP0107 (59 kDa); Coluna 3, MHP0660 (37 kDa). As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes.

A identificação e caracterização de proteínas antigênicas é um passo importante não apenas para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, mas também para o desenvolvimento de vacinas para o controle da PES. Desta forma, as proteínas recombinantes purificadas foram avaliadas quanto

ao reconhecimento por anticorpos produzidos durante a infecção natural, através da técnica de *Western blot*. Todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas especificadamente quando confrontadas com os soros de suínos convalescentes e imunizados. A proteína hipotética MHP0660 foi mais reativa quando confrontada com soro de suínos convalescentes ao passo que a proteína MHP418 mostrou-se mais reativa quando confrontada com soro de suínos previamente imunizados com a cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (Fig. 4). Esta diferença na reatividade pode ocorrer devido à diferença na produção de anticorpos em animais naturalmente infectados de animais experimentalmente infectados. Possivelmente algumas proteínas do *M. hyopneumoniae* são expressas somente durante a infecção. Este fato pode explicar a diferença no reconhecimento destas proteínas nesse estudo. Estas proteínas que foram reconhecidas por soros de suínos naturalmente infectados são alvos possivelmente mais promissores para testes clínicos como vacinas. O reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos presentes no soro de suínos convalescentes indica que estas proteínas são expressas pela bactéria durante a infecção, tornando-as candidatas promissoras ao desenvolvimento de vacinas. Além disso, o cultivo *in vitro* pode alterar a expressão de algumas proteínas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o que poderia também explicar a diferença na reatividade obtida utilizando soro hiperimune. A Figura 4 demonstra o resultado obtido no *Western blot* das três proteínas recombinantes confrontadas com soros de suínos. Uma banda de aproximadamente 80 kDa da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* reage visivelmente quando confrontada com soro de suínos convalescentes (Figura 4A), ao passo que esta reação é menos intensificada quando a mesma cepa é confrontada com soro hiperimune de suíno (Figura 4B). Este resultado dá suporte à sugestão de que há indução diferenciada de anticorpos quando os animais são experimentalmente ou naturalmente infectados. Um trabalho semelhante a este avaliou a antigenicidade de duas proteínas recombinantes (MHP651 e MHP378), as quais foram reconhecidas especificadamente por anticorpos presentes no soro de suínos convalescentes (Meens et al., 2006).

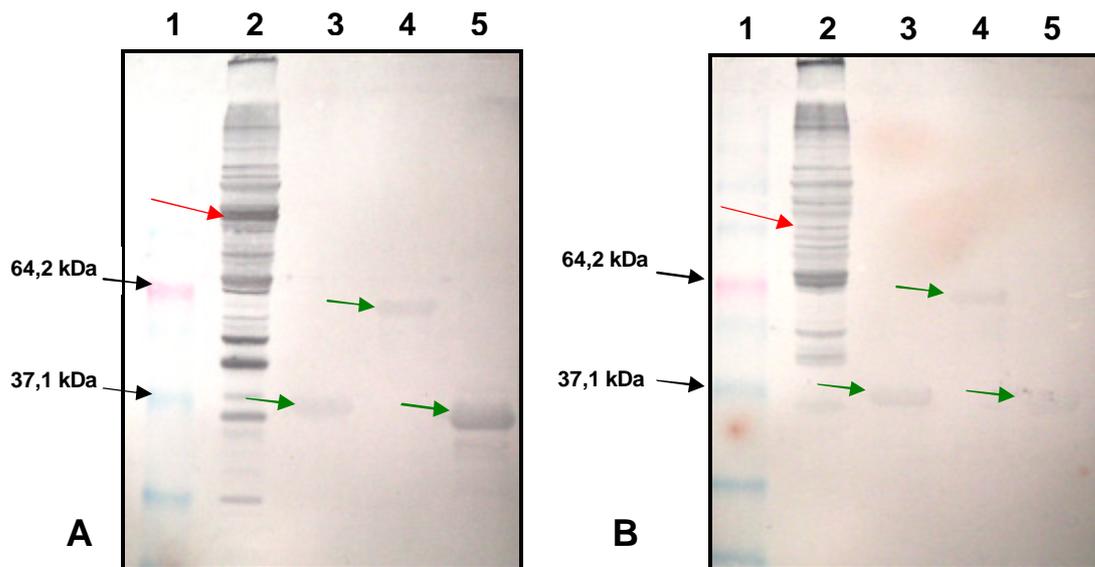


Figura 4. *Western blot* das três proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas com: **A.** soro de suíno convalescente (diluído 1:100) e **B.** soro de suíno hiperimune (diluído 1:100). Anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:2000) foi utilizado como anticorpo secundário. Coluna, Marcador pré-corado; Coluna 2, extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448; Coluna 3, MHP0418 (38 kDa); Coluna 4, MHP0107 (59 kDa); Coluna 5, MHP0660 (37 kDa). As setas verde indicam as bandas imunoreativas. As setas vermelhas indicam uma banda de aproximadamente 80 kDa do extrato da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* que reagiu diferencialmente quando confrontada com soro de suínos convalescente e com soro hiperimune de suíno.

Na técnica de *Western blot*, as proteínas recombinantes são desnaturadas. Esta condição pode impedir a exposição de epítopos conformacionais, causando uma intensidade de reatividade muitas vezes errônea. Dessa forma, técnicas onde estas proteínas permaneçam na sua conformação íntegra são recomendadas para reforçar os resultados. Além disso, neste trabalho foram produzidas proteínas recombinantes que correspondem a apenas uma parte da proteína nativa. Portanto, há a possibilidade de a porção antigênica da proteína não ter sido selecionada.

4 CONCLUSÃO

Para tornar possível o desenvolvimento de uma vacina e/ou teste diagnóstico faz-se necessária a compreensão dos mecanismos de virulência e patogenicidade deste microrganismo. Neste estudo, três proteínas recombinantes de

M. hyopneumoniae foram purificadas e avaliadas quanto a sua antigenicidade. Estas foram especificamente reconhecidas por soros de suínos naturalmente infectados, demonstrando serem candidatas potenciais para uso no desenvolvimento de uma vacina de subunidade. Por deste motivo, estudos adicionais avaliando a imunogenicidade destas proteínas estão sendo realizados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. 2004. The Genome Revolution in Vaccine Research. **Curr. Issues Mol. Biol.** v.6, p.17-28.
2. JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. 2002. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology.** H 71, p.234.
3. LIN, J.H.; WENG, C.N.; LIAO, C.W.; YEH, K.S.; PAN, M.J. 2003. Protective Effects of Oral Microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine Prepared by Co-Spray Drying Method. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.65, p.69-74.
4. OKAMBA, F.R.; MOREAU, E.; CHEIKH SAAD BOUH, K.; GAGNON, C.A.; MASSIE, B.; ARELLA, M. 2007. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal Portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. 2007. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p. 767-774, n. 6.
5. RAMOS, C.R.R.; ABREU, P.A.E.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L. 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. Med. Biol. Res.** v.37, p.1103-1109.
6. RAPPUOLI, R. 2001. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial Meningitis. **Vaccine – Short Communication.** v.19, p. 2319-2322.
7. RAZIN, S; YOGEV, D; NAOT, Y.1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.1094–1156.
8. ROSS, R.F., LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLL, E. 1986. Diseases of Swine. **Mycoplasma Disease.** The Iowa State University Press, Ames, IA, p. 469–483.

9. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. 1999. Pneumonia enzoótica. **Clínica e Patologia Suína**, 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359.
10. THACKER, E. L., HALBUR, P. G., ROSS, R. F., THANAWONGNUWECH, R. & THACKER, B. J. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **J Clin Microbiol**, v.37, p.620–627.
11. 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.; ASSUNCAO, 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.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, 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.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A.. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **J. Bacteriol.** v.187, p.5568–5577.
12. WASSENAAR, T.M., GAASTRA, W. 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiol. Lett.** v.201, p.1–7.

CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho permitiu a purificação de três novas proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* e a avaliação de sua antigenicidade, o que representa um passo científico importante para a definição de novas estratégias de controle para a Pneumonia Enzoótica Suína. Além da formação acadêmica, a execução deste TCC proporcionou minha iniciação na pesquisa científica dando-me oportunidades para seguir na vida acadêmica, a qual intento permanecer.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. et al. In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.73, p.7784-7787, 2005.
- ADERKA, D., Le, J.M., VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide- induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells and in mice. **J. Immunol.** V.143, p.3517–3523. 1989.
- ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology, **Vaccine**, v.21. p.605– 610, 2003.
- AMERI, M. et al. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.198–201, 2006.
- ASSUNÇÃO, P.; RAMIRES, A.; FE, C.; LLAMAZARES, O.; POVEDA, J. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. **Vet. Res. Commun.** V.29, p.563–574. 2005.
- BANDRICK, M.; PIETERS, M.; PIJOAN, C.; MOLITOR, T. Passive Transfer of Maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-Specific Cellular Immunity to Piglets. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n.3, p.540-543. 2008.
- BARGEN, L. E. A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p.856-859, 2004.
- BLANCHARD, B; VENA, M.M.; CAVALIER, A.; LE LANNIC, J.; GOURANTON, J.; KOBISCH, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet Mic.**, v.30, p.329–341, 1992.

BURNETT, T.; DINKLA, K.; ROHDE, M.; CHHATWAL, G.; UPHOFF, C.; SRIVASTAVA, M.; CORDWELL, S.; GEARY, S.; LIAO, X.; MINION, D. WALKER, M.; DJORDJEVIC, S.; P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. **Molecular Microbiology**. V.3, p. 669–686, 2006.

CAI, H.Y. et al. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.91–95, 2007.

CALUS, D.; BAELE, M.; MEYNS, T. KRUIF, A.; BUTAYE, P.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, A.; MAES, D. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. **Veterinary Microbiology**., v.120, p.284-291, 2007.

CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. The Genome Revolution in Vaccine Research. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.6, p.17-28, 2004.

CARON, J. et al. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1390–1396, 2000.

CHEN, Y.L. et al. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. **Infection and Immunity**, v.71, p.1155–1160, 2003.

CHEN, A.Y. et al. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. **Journal of medical microbiology**, v.55, p. 923–929, 2006a.

CHEN, A.Y. et al. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.252–259, 2006b.

CHEN, A.Y. et al. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. **Vaccine**, v.26, p.4372-4378, 2008.

CHEN, J.; ZHANG, L.; SONG, J.; HWANG, F.; DONG, Q.; LIU, J. Comparative analysis of glycoprotein and glycolipid composition of virulent and avirulent strain membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Curr. Microbiol.**, v.24, pl 189-192, 1992.

CHEN, J.R.; LIAO, C.W.; MAO, C.N.W. A recombinant chimere composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: *in vivo* evaluation of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, v.80, p.347-357, 2001.

CHOI, C.; KWON, D.; JUNG, K.; HA, Y.; LEE, Y. H.; KIM, O.; PARK, H. K.; KIM, S. H.; HWANG, K. K.; CHAE, C. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Comp. Path.**, v.134, p.40-46, 2006.

CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R.; DE LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* Increases the Susceptibility of Pigs to Experimental *Pasteurella multocida* Pneumonia. **Can J Vet Res.**, v.52, p.434-438, 1988.

CLARK, L., FREEMAN, M., SCHEIDT, A., KNOX, K. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. **Vet. Med.** V.86, p.543–550.1991.

CONCEIÇÃO, F.R. et al. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734–5743, 2006.

DJORDJEVIC, S. et al. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. **Australian veterinary journal**, v.75, p.504–511, 1997.

DJORDJEVIC, S.P., CORDWELL, S.J., DJORDJEVIC, M.A., WILTON, J., MINION, F.C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesion. **Infect. Immun.** V.72, p.2791–2802. 2004.

DUBOSSON, C.R. et al. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.102, p.55–65, 2004.

DYBVIG, K.; VOELKER, L.L. Molecular Biology of Mycoplasmas. **Annual review of microbiology**, v.50, p.25–57, 1996.

FAGAN, P.K.; DJORDJEVIC, S.P.; EAMENS, G.J.; CHIN, J.; WALKER, M.J. Molecular Characterization of a Ribonucleotide Reductase (*nrdF*) Gene Fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and Assessment of the Recombinant Product as an Experimental Vaccine for Enzootic Pneumonia. **Infect. Immun.**, v.64, p.1060–1064, 1996.

FAGAN, P.K.; WALKER, M.; CHIUN, J.; EAMENS, G.J.; DJORDJEVIC, S.P. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial Pathogenesis**, v. 30, p.101-110, 2001.

FANO, E.; PIJOAN, C.; DOES, S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.69, p. 223-228, 2005.

FREY, J.; HALDIMANN, A.; NICOLET, J. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.42, p.275-280, 1992.

FRIIS, N.F. *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* in comparative pathogenicity studies. **Acta. Vet. Scand.** V.15, p.507–518. 1974.

FRIIS, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. **Nord Veterinary Medicine**, v.27, p.337-339, 1975.

FUTO, S.; SETO, Y.; MITSUSE, S.; MORI, Y.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. **J. Bacteriol.**, v.177, p.1915–1917, 1995.

GEARY, S.; WALCZAK, E. 1985. Isolation of a cytopathic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infect. Immun.** v.48, p.576-578.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v.100; p.255-268, 2004.

HALDIMANN, A., NICOLET, J. and FREY, J. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.317–323.1993.

HANNAN, P. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. **Vet. Res.** V.31, p. 373-395. 2000.

HSU, T., MINION, C. Identification of the Cilium Binding Epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. **Infection and Immunity**, v.66, n. 10, p. 4762-4766, 1998.

HWANG, M.; CHANG, Z.; KANG, E.; LIM, J.; YUN, H.; RHEE, M.; JEONG, K.; PARK, S. Surfactin C inhibits *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced transcription of proinflammatory cytokines and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells. **Biotechnol Lett.** V. 30, P.229–233. 2008.

INAMOTO, T., TAKAHASHI, H., YAMAMOTO, K., NAKAI, Y., OGIMOTO, K. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. **J. Vet. Med. Sci.** v.56, p.393–394. 1994.

JANG, E.J.; KIM, T.J. In vitro expression of the 50-kDa and 30-kDa fragments of the P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and their use for serodiagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.278–282, 2007.

JENKINS, C.; WILTON, J.; MINION, C. FALCONER, L. WALKER, M. DJORDJEVIC, S. Two Domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* Cilium Adhesin Bind Heparin. **Infection and Immunity.** V.74, n.1, p.481-487. 2006.

KIM, M.F.; HEIDARI, M.B.; STULL, S.J.; MCINTOSH, M.A.; WISE, K.S. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment, **Infect. Immun.**, v.58. p.2637–2643, 1990.

JONES, G., RAPP-GABRIELSON, V., WILKE, R., THACKER, E., THACKER, B., GERGEN, L., SWEENEY, D., WASMOEN, T. Intradermal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Swine Health Prod.** V.13, p.19–27. 2004.

KING, K. et al. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. **Vaccine**, v.15, p.25-35, 1996.

KOKOTOVIC, B., FRIIS, N.F., JENSEN, J.S., AHRENS, P. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. **J. Clin. Microbiol.** V.37, p.3300–3307. 1999.

KUGLER, J.; NESWANDT, S.; GERLACH, G.; MEENS, J.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. Identification of immunogenic polypeptides from a *Mycoplasma hyopneumoniae* genome library by phage display. **Appl Microbiol Biotechnol.** V.80, p. 447-458. 2008.

KURTH, K.T. et al. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.463–469, 2002.

LE CARROU, J., LAURENTIE, M., KOBISCH, M., GAUTIER-BOUCHARDON, A.V. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.50, n.6, p.1959–1966. 2006.

LIN, J. et al. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.69–74, 2003.

LIVINGSTON, D.W., STAIR, E.L., UNDERDAHL, N.R., MEBUS, C.A. Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia in swine. **Am. J. Vet. Res.** V.33, p.2249–2258. 1972.

LORENZO, H.; QUESADA, O.; ASSUNÇÃO, P.; CASTRO, A.; RODRIGUEZ, F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma*

hyopneumoniae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p.199-207, 2006.

MADSEN, L. M.; ONEAL, M. J.; GARDNER, S. W.; STRAIT, E.L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; MINION, F. C. Array-Based Genomic Comparative Hybridization Analysis of Field Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, p. 7977–7982, 2007.

MAES, D. et al. Enzootic pneumonia in pigs. **Veterinary Quarterly**, v.18, p.104-109, 1996.

MAES, D. et al. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. **Vaccine**, v.17, p.1024–1034, 1999.

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 126, p. 297–309. 2008.

MAROIS, C. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.96–104, 2007.

MAYOR, D.; ZEEH, F.; FREY, J.; KUHNERT, P. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. **Vet. Res.**, v.38, p. 391–398, 2007.

MEENS,V; SELKE,V; GERLACH, G-F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. **Vet. Microbiol.**, v.116, p. 85–95, 2006.

MEYNS, T., DEWULF, J., DE KRUIF, A., CALUS, D., HAESEBROUCK, F., MAES, D., Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. **Vaccine**, v.24, p.7081–7086, 2006.

MINION, FC, LEFKOWITZ, EJ., MADSEN, ML, CLEARY, BJ, SWARTZELL, SM, MAHAIRAS, GG. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **J Bacteriol.**, v.186, p.7123–7133, 2004.

MUNETTA, Y.; MINAGAWA, Y.; SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; HIKONO, H.; MORI, Y. Immune Response of Gnotobiotic Piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Vet. Med. Sci.** v.70, n.10, p. 1065–1070, 2008.

MURPHY, D., VAN ALSTINE, W., CLARK, K., ALBREGTS, S., KNOX, K.,. Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Am. J. Vet. Res.** V.54, p.1874–1880, 1993

OKADA, M. et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.251-259, 2005.

OKAMBA, F. et al. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 adhesin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.767–774, 2007.

ONEAL, M.; SCHAFER, E.; MADSEN, M.; MINION, F. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. **Microbiology**, v.154, p.2581–2588. 2008.

PARK, S.C., YIBCHOK-ANUN, S., CHENG, H., YOUNG, T.F., TACKER, E.L., MINION, F.C., ROSS, R.F., HSU, W.H. *Mycoplasma hyopneumoniae* increased intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. **Infect. Immun.** V.70, p.2502–2506. 2002

PIETERS, M.; PIJOAN, C.; FANO, E.; DEE, S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. **Vet. Microbiol.** 2008.

PINTO, P.M. et al. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.83–93, 2007.

RAPPUOLI, R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial Meningitis. **Vaccine – Short Communication**, v.19, p. 2319-2322, 2001.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.1094-1156, 1998.

RODRIGUEZ, F.; QUESADA, O.; POVEDA, J. B.; FERNANDEZ, A.; LORENZO, H. Immunohistochemical Detection of Interleukin-12 and Interferon- γ in Pigs Experimentally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Comp. Path.**, v.136, p.79-82, 2007.

RODRIGUEZ, F.; RAMIREZ, G. A.; SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; LORENZO, H. Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Comp. Path.**, v. 130, p.306–312, 2004.

ROSS, R.F., LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLL, E. Diseases of Swine. **Mycoplasma Disease**, The Iowa State University Press, Ames, IA. p. 469–483, 1986.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E. et al. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames, 1999. Cap.36, p. 495–505.

SIBILA, M. et al. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in twelve farms with different production systems. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.68, p.12–18, 2004.

SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; RAMIREZ, A. S.; FERNANDEZ, A.; GO MEZ-VILLAMANDOS, J. C.; JOVER, A.; LORENZO, H.; HERRA´EZ, P.; RODRI´GUEZ, F. A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet Pathol.**, v.40, p.:395–404, 2003.

SCARMAN, A.L., CHIN, J.C., EAMENS, G.J., DELANEY, S.F., DJORDJEVIC, S.P. Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling. **Microbiology** v.143,p. 663–673. 1997.

SIBILA, M. et al. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.352–356, 2007a.

SIBILA, M. et al. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.97–107, 2007b.

SIBILA, M.; BERNAL, R.; TORRENTS, D.; RIERA, P.; LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.165-170, 2008.

SHIMOJI, Y.; OISHI, E.; MUNETA, Y.; NOSAKA, H.; MORI, Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**, v.21, p.532–537, 2003.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; et al. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2^a ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.

SORENSEN, V., AHRENS, P., BARFOD, K., FEENSTRA, A., FELD, N., FRIIS, N., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N., PEDERSEN, M., Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. **Vet. Microbiol.**, v.54, p.23–34, 1997.

STAKENBORG, T. et al. Comparison of molecular techniques for the typing of Mycoplasma hyopneumoniae isolates. **Journal Microbiology Methods**, v. 66, p.263–275, 2006.

STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BUTAYE, P.; MAES, D.; PEETERS, J.; KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F. The diversity of Mycoplasma hyopneumoniae within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v.109, p.29-36, 2005.

STRAIT, E. L. et al. Real-time PCR assays to address genetic diversity in Mycoplasma hyopneumoniae. Journal of Clinical Microbiology, v.46, p.2491-2498, 2008.

STRASSER, M.; FREY, J.; BESTETTI, G.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of Mycoplasma hyopneumoniae in Escherichia coli. **Infect. Immun.**, v.59, p.1217–1222, 2001.

TAJIMA, M., YAGIHASHI, T., NUNOYA, T., TAKEUCHI, A., OHASHI, F. Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. **Am. J. Vet. Res.** V.45, p.1928–1932. 1984.

THACKER, E.; HALBUR, P.; ROSS, R.; THANAWONGNUWECK, R.; TRACKER, B. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation and respiratory syndrome virus induced pneumonia. *Journal Clinical Microbiology*, v.37, p. 620-627, 1999.

THACKER, EL; THACKER, BJ; KUHN, M; HAWKINS, PA; WATERS, WR. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **Am J Vet Res.**, v.61, p.1384–1389, 2000.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*, **Anim. Health Res**, 2004.

THACKER, E., Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S., TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of Swine**, 9th ed. Blacwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp.701–717, 2006.

THANAWONGNUWECH, R., YOUNG, T. F., THACKER, B. J. AND THACKER, E. L. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRSSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, p.115-127. 2001.

VAN HAM, R.C.; KAMERBEEK, J.; PALACIOS, C.; RAUSELL, C.; ABASCAL, F.; BASTOLLA, U.; FERNANDEZ, J. M.; JIMENEZ, L.; POSTIGO, M.; SILVA, F. J.; TAMAMES, J.; VIGUERA, E.; LATORRE, A.; VALENCIA, A.; MORAN, F.; MOYA, A. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.100, p.581-586, 2003.

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.; ASSUNCAO, 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.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI,

F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, 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.; MARANHAO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.; MOREIRA, M.A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.E.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **J. Bacteriol.**, v.187, p.5568–5577, 2005.

VERDIN, E. et al. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washing from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.31–40, 2000.

VICCA, J. et al. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infections in Belgian Farrow-to-Finish Pig Herds with Diverging Disease-Course. **Journal of veterinary medicine B**, v.49, p.349–353, 2002.

VICCA, J. et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology**, v.97, p.177–190, 2003.

VICCA, J. et al. In Vitro Susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.4470-4472, 2004.

ZHANG, Q; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. **Infect.Immun.**, v.62, n.10, p.4367-73, 1994.

ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. **Infect.Immun.**, v.63, n.3, p.1013-9, 1995.

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

WISE, K.S., KIM, M.F. Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. **J. Bacteriol.** V.169, p.5546–5555. 1987