

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Caracterização imunológica da sinal-peptidase I de
Mycoplasma hyopneumoniae

Fernanda Munhoz dos Anjos Leal

Pelotas, 2012

Fernanda Munhoz dos Anjos Leal

Caracterização imunológica da sinal-peptidase I de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Cláudia Pinho Hartleben

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vagheti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

L43c

Leal, Fernanda Munhoz dos Anjos

Caracterização imunológica de uma proteína de membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* / Fernanda Munhoz dos Anjos Leal. – 39f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2013. – Orientador Cláudia Pinho Hartleben; co-orientador Henrique Bunselmeyer.

1.Biotecnologia. 2.*Mycoplasma hyopneumoniae*.
3.Vacinas recombinantes. 4.Sinal peptidase I. 5.
Imunodiagnóstico. I.Hartleben, Cláudia Pinho. II.Ferreira,
Henrique Bunselmeyer. III.Título.

CDD:574.19245

BANCA EXAMINADORA

Dr. Leonardo Garcia Monte, Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Marta Gonçalves Amaral, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Bianca Sica Siedler, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha mãe. Ela é a base de tudo o que sou hoje”.

Agradecimentos

Primeiramente a minha mãe, pelo apoio incondicional recebido, me ajudando nos momentos de preocupação, com muita calma. Por estar sempre ao meu lado, me incentivando e abrindo os meus olhos, muitas vezes para os meus próprios sentimentos.

À toda a minha família, pelo apoio e incentivo durante os quatro anos de graduação, sempre me apoiando para eu alcançar meus objetivos. Principalmente aos meus primos, Laura e Otávio, pela amizade compartilhada como irmãos.

Ao meu namorado Cristiano Zimmer, por todo amor, companheirismo e dedicação em me ouvir, me aconselhar e me incentivar sempre.

Um agradecimento especial a minha orientadora Cláudia Pinho Hartleben, pela oportunidade de aprender e crescer profissionalmente e pessoalmente durante esses 3 anos na graduação. Também pela confiança depositada em mim para a realização dos trabalhos realizados no laboratório.

Muito obrigado a todos os colegas do laboratório, principalmente a Gizele, Leonardo, Thaís e Marina pelo apoio, companheirismo, risadas, mates e amizade, tornando o ambiente de trabalho muito alegre.

Ao professor Henrique B. Ferreira, do Laboratório de Genômica Funcional e Estrutural da UFRGS, pela receptividade ao me receber no seu laboratório, oportunidade de realizar este trabalho e pela excelente orientação durante o meu período de estágio final. Agradeço também, a todos os estudantes do laboratório em especial ao grupo do mycoplasma, Jéssica Paes, Veridiana Virginio e Rafaela Bonotto.

As minhas colegas de graduação, pelo convívio e amizade, dividindo as alegrias, as preocupações e os trabalhos.

À Deus.

Muito Obrigado!

Resumo

LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos. **Caracterização imunológica da sinal-peptidase I de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2012. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente causador da pneumonia enzoótica suína (PES). A PES é uma doença caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade, atingindo suínos de todas as idades. Infecções por *M. hyopneumoniae* causam grandes perdas econômicas pelo retardo no crescimento, redução da conversão alimentar e pelo aumento do uso de antibióticos. Através do sequenciamento de linhagens de *M. hyopneumoniae*, sistemas de exportação de proteínas foram identificados. Uma das proteínas envolvidas neste processo é a sinal peptidase I. A sinal peptidase I encontra-se na membrana externa da bactéria e tem se mostrado essencial para a sobrevivência de outras espécies bacterianas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar imunologicamente a SPase I de *M. hyopneumoniae* (MhSPase I). Para isso, foi realizado a produção em *Escherichia coli* da proteína recombinante rMhSPase I. A proteína rMhSPase I foi purificada e utilizada em ensaios de imunizações de camundongos BALB/c. A avaliação da imunogenicidade foi feita por ELISA indireto. A resposta imune celular foi determinada através da detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos de camundongos cultivados *in vitro*, e estimulados com a rMhSPase I. Os resultados obtidos demonstraram que a rMhSPase I é altamente imunogênica e induz uma forte resposta celular do tipo Th2, com altos níveis de secreção de interleucina-10. Desse modo, a rMhSPase I pode vir a ser uma boa candidata para a formulação de vacinas recombinantes contra a PES. No entanto, estudos envolvendo a imunização de suínos devem ser posteriormente realizados.

Palavras chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, sinal peptidase I, vacinas recombinantes, imunodiagnóstico

Abstract

LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos. **Caracterização imunológica da sinal-peptidase I de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2012. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of porcine enzootic pneumonia (PEP). PEP is a disease characterized by high morbidity and low mortality, affecting pigs of all ages. Infection by *M. hyopneumoniae* causes great economic loss through growth retardation, reduction of feed efficiency and also increased use of antibiotics. Protein export systems have been identified, through *M. hyopneumoniae* sequenced strain. One of the proteins involved in this process is the signal-peptidase I. The signal-peptidase I is localized in the exterior bacteria membrane and has been shown to be essential for the survival of other bacterial species. Thus, the objective of this study was to characterize immunologically the SPase I of *M. hyopneumoniae* (MhSPase I). For this reason, the production of recombinant protein rMhSPase I was performed in *Escherichia coli*. This protein was purified and used for mice immunization trials. The evaluation of immunogenicity was performed by indirect ELISA. The cellular immune response was made by detection of cytokines secreted by mice splenocytes cultivated in vitro and stimulated with rMhSPase I. The results showed that I rMhSPase is highly immunogenic and induces a strong Th2 cell response, with high levels of interleukin-10 secretion. Thus, rMhSPase I might be a good potencial for the formulation of recombinant vaccines against PEP. However, further studies involving porcine immunization with this protein should be carried out.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, signal-peptidase I, recombinant vaccines, immunodiagnostic

Lista de Figuras

Figura 1.....24

Figura 2.....26

Figura 3.....28

Figura 4.....29

Figura 5.....30

Lista de Abreviaturas e Siglas

PES – Pneumonia enzoótica suína

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PRDC – Porcine respiratory disease complex

PCR - Polymerase Chain Reaction

DNA - Deoxyribonucleic acid

ELISA – Enzyme linked immuno sorbent assay

PS – Peptídeo sinal

CDS - Coding DNA Sequence

GST – Glutathione-S-transferase

DO – Densidade óptica

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactósido

RPM – Rotações por minuto

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

EU – Unidades de endotoxina

FDA – Food and Drug Administration

OPD – o-phenylenediamine dihydrochloride

PBS – Phosphate buffer saline

SFB – Soro fetal bovino

IL-4 – Interleucina-4

IL-10 – Interleucina-10

INF- γ – Interferon gama

IL-6 – Interleucina-6

IL-1 – Interleucina-1

RNA – Ribonucleic acid

CBiot – Centro de Biotecnologia

Kg – Quilogramas

PEP – Porcine enzootic pneumonia

ELISA –T – Enzyme Linked Immuno sorbent assay – Tween 20

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	13
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Revisão Bibliográfica	15
3.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e a PES.....	15
3.2. Diagnóstico, controle e tratamento da PES.....	16
3.3. Vacinas para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	18
3.4. Antígenos para imunodiagnóstico e desenvolvimento de vacinas para a PES.....	19
3.5. Sinal-peptidase I.....	21
4. Relatório de Estágio	23
4.1. Produção e purificação da proteína recombinante SPase I (rSPase I)	23
4.2. Remoção de endotoxinas da proteína rSPase I	24
4.3. Imunização dos camundongos.....	25
4.4. Avaliação da resposta imune humoral induzida pela rSPase I.....	25
4.5. Avaliação da resposta imune celular através da detecção das citocinas interleucina-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4).....	27
5. Outras atividades desempenhadas no período de estágio	29

5.1. Cultivo de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> linhagem 7448 e <i>Mycoplasma flocculare</i> e extração de RNA.....	29
5.2. Reuniões semanais de grupo.....	30
5.3. Seminários de dados.....	30
5.4. Seminários do CBiot.....	31
6. Conclusões e Perspectivas	31
7. Referências Bibliográficas.....	32

1. Introdução Geral

Este relatório descreve as atividades realizadas durante o período destinado à disciplina de Estágio Supervisionado de Conclusão de Curso, do curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. O estágio foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do professor Henrique B. Ferreira. O início das atividades práticas se deu no dia 30 de julho de 2012.

No Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, os estudos com antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* iniciaram em 2008, com uma parceria com a Universidade Federal de Pelotas. Este projeto visa a produção de antígenos recombinantes para a formulação de vacinas contra a pneumonia enzoótica suína (PES).

Durante o período de estágio, realizei atividades que envolveram a produção de um antígeno recombinante com potencial uso vacinal. Para tal, as atividades incluíram a manutenção e esterilização de materiais utilizados na rotina do laboratório, preparo de soluções, produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, purificação e quantificação de proteínas recombinantes, remoção de endotoxinas de proteínas recombinantes, imunização, coleta de sangue e eutanásia de animais, avaliação da resposta imune humoral e celular induzida pela proteína recombinante em camundongos. Concomitante a essas atividades também houve a participação nos seminários de dados e do Centro de Biotecnologia da UFRGS e nas reuniões semanais de resultados e discussão de artigos do grupo de pesquisa.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar imunologicamente uma proteína de membrana de *M. hyopneumoniae*, sinal-peptidase I, quanto a resposta imune humoral e celular induzida em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir a proteína recombinante MhSPase I em *E. Coli*;
- Remover as endotoxinas da proteína recombinante MhSPase I;
- Imunizar camundongos BALB/c com a rMhSPase I;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular induzida pela rMhSPase I em camundongos;

3. Revisão Bibliográfica

3.1. *Mycoplasma hyopneumoniae* e a PES

Mycoplasma hyopneumoniae é um procarioto pertencente ao filo *Tenericutes*, classe *Mollicutes*. Esta bactéria patogênica, causadora da pneumonia enzoótica suína (PES), possui tamanho diminuto (0,2 – 0,5 μm), genoma reduzido (aproximadamente 0,9 Mb) e ausência total de parede celular (Maes, *et al.*, 1996; Razin, *et al.*, 1998; Barré, *et al.*, 2004). Após a infecção, *M. hyopneumoniae* adere ao epitélio ciliado do trato respiratório levando a ciliostase, que causa a degeneração e desaparecimento dos cílios, esfoliação das células epiteliais e aparecimento de exsudato nas vias aéreas (Jacques, *et al.*, 1992). A principal forma de transmissão do agente é o contato direto entre os animais, e a introdução de suínos infectados em rebanhos sem exposição prévia à enfermidade é o meio mais frequente de disseminação da doença (Goodwin, 1985; Ross e Young, 1993). O desenvolvimento da PES depende da virulência do agente, número de organismos presente no ambiente, suscetibilidade imunológica dos animais e infecções concomitantes com outros patógenos (Desrosiers, 2011).

A PES é uma doença caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade, atingindo suínos de todas as idades. Infecções por *M. hyopneumoniae* causam grandes perdas econômicas pelo retardo no crescimento, redução da conversão alimentar e pelo aumento do uso de antibióticos (Maes, *et al.*, 2008; Machado, *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que a infecção com *M. hyopneumoniae* também predispõe suínos a infecções secundárias por outros agentes patogênicos como *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*, ou *Pasteurella multocida*, podendo levar a um aumento da gravidade das lesões pulmonares e diminuição da capacidade de produção (Wilson, *et al.*, 2012). Quando patógenos secundários

estão envolvidos os sinais clínicos envolvem febre, dificuldade para respirar, podendo levar a morte (Maes, *et al.*, 1996).

M. hyopneumoniae também é um dos mais importante agentes envolvido no complexo de doenças respiratórias suína (PRDC, do inglês Porcine Respiratory Disease Complex), A PRDC envolve patógenos bacterianos já citados anteriormente e virais, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína, circovírus suíno tipo 2, vírus da doença de Aujeszky, vírus da gripe suína e coronavírus respiratório suíno. A PRDC é caracterizada clinicamente por baixa taxa de crescimento e eficiência da conversão alimentar, febre, tosse, dispneia e anorexia (Sibila, *et al.*, 2009).

3.2. Diagnóstico, controle e tratamento da PES

Os sinais clínicos e as lesões podem levar a um diagnóstico provisório, mas testes laboratoriais são necessários para a confirmação do diagnóstico da PES (Thacker, 2004). O isolamento e cultura do organismo é o padrão ouro, mas não são utilizados como rotina pela dificuldade de isolamento do microrganismo e contaminação com outros micoplasmas suínos, como *M. hyorhinis* ou *M. flocculare* (Maes, *et al.*, 2008; Sibila, *et al.*, 2009). Métodos baseados em PCR são mais rápidos do que a cultura bacteriológica, apresentam menor custo de execução e tem sido descritos para a detecção de DNA de *M. hyopneumoniae* em diferentes amostras. Porém a não discriminação de organismos vivos ou mortos acaba por determinar que a PCR não determine entre a presença de infecção ativa e resquícios de *M. hyopneumoniae* de outras infecções (Sibila, *et al.*, 2009).

Devido as desvantagens apresentadas pela técnica de PCR, testes sorológicos são os mais comumente usados no monitoramento de doenças em

rebanhos suínos, como teste ELISA e, menos frequentemente, teste de fixação do complemento (Sibila, *et al.*, 2009). Para a detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*, três testes ELISA comerciais são os mais frequentemente utilizados, um ELISA de bloqueio monoclonal (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA kit, Oxoid) (Feld, *et al.*, 1992), dois ELISAs indiretos, Tween 20-ELISA, ou ELISA-T (Nicolet, *et al.*, 1980) e HerdCheck®, IDEXX. Porém a variação nos resultados entre os ELISA testados, a incapacidade de diferenciar infecção natural de vacinação, variação de tempo entre cada animal na soroconversão e variação na detecção de anticorpos contra diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* geram dificuldades no diagnóstico preciso da doença (Sibila, *et al.*, 2009).

A primeira medida para o controle da infecção por *M. hyopneumoniae* são as melhorias das práticas de gestão. Sistemas como *all-in all-out* de produção, podem interromper o ciclo de transmissão de organismos patogênicos para suínos mais jovens. Esse sistema permite que o produtor adapte as condições ambientais para um grupo de animais, além de possibilitar a limpeza das instalações entre grupos de porcos. Também é um sistema de produção fechado, o que faz com que a imunidade do grupo de animais não se desestabilize. Outras medidas de controle incluem diminuição da densidade de animais durante as diferentes fases de produção, melhorias das condições de habitação, como pontos de temperatura, entrada de ar e ventilação, e diminuição do tamanho do rebanho, sendo os resultados deste último variados quanto à correlação tamanho do rebanho e soroprevalência de *M. hyopneumoniae* (Maes, *et al.*, 2008).

O uso de antimicrobianos também pode ser utilizado como estratégia para o controle e tratamento da infecção, sendo as tetraciclínas e os macrolídeos os mais usados. Lincosamidas, pleuromutilinas, fluoroquinolonas, florfenicol,

aminoglicosídeos e aminociclitol também são outros antimicrobianos potencialmente ativos contra *M. hyopneumoniae*. A combinação de antimicrobianos que também são ativos contra bactérias secundárias que complicam a infecção por *M. hyopneumoniae* também são indicados. Devido a ausência de parede celular, *M. hyopneumoniae* é resistente a β -lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas (Vicca, *et al.*, 2004; Maes, *et al.*, 2008).

3.3. Vacinas para *Mycoplasma hyopneumoniae*

As vacinas comerciais disponíveis atualmente e utilizadas em todo mundo consistem de preparações inativadas de células inteiras. A vacinação é aplicada em mais de 70% dos rebanhos suínos e suas vantagens incluem a melhoria do ganho de peso diário, conversão alimentar e algumas vezes a taxa de mortalidade (Maes, *et al.*, 1998; Maes, *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos indicam que as vacinas utilizadas recentemente reduzem o número de microrganismos no trato respiratório (Meyns, *et al.*, 2006) e pode diminuir o número de infecções no rebanho (Sibila, *et al.*, 2007).

As vacinas disponibilizadas não impedem a colonização do trato respiratório pelo *M. hyopneumoniae* e outros estudos mostraram que, apesar de reduções significativas nos sinais clínicos e lesões pulmonares, houve redução limitada e não significativa na transmissão de *M. hyopneumoniae* entre animais. (Meyns, *et al.*, 2006; Maes, *et al.*, 2008). Entre as causas bacterianas de doença respiratória em suínos nos EUA, *M. hyopneumoniae* é a segunda mais comum, seguida da *Pasteurella multocida* e, apesar da vacinação generalizada, pneumonia por micoplasma continua a ser uma grande preocupação para os produtores de suínos (Opriessnig, *et al.*, 2011).

3.4. Antígenos para imunodiagnóstico e desenvolvimento de vacinas para a PES

Foram disponibilizados até o momento as sequências completas dos genomas das linhagens patogênicas 7448, 232 e 168 e da linhagem não patogênica J de *M. hyopneumoniae*. A análise destes dados abriu novas perspectivas para o entendimento desta espécie, com foco principalmente, em estudos envolvendo seu metabolismo e virulência (Minion, *et al.*, 2004; Vasconcelos, *et al.*, 2005).

A adesão do *M. hyopneumoniae* aos cílios do trato respiratório de suínos é um pré-requisito para o início da infecção e esse processo é mediado por moléculas na sua membrana plasmática, principalmente proteínas chamadas adesinas (Zielinski e Ross, 1993). Pinto *et al.* (2007) foram capazes de detectar cinco proteínas associadas com citoaderência P76, P97, p146, P216 e LPPT mesmo nas condições de cultura de laboratório, enquanto Li *et al.* (2009), por sua vez demonstraram níveis mais elevados de expressão da adesina P97, da proteína de 50 kDa derivada da adesina P159 e da proteína de 43 kDa derivada da clivagem proteolítica da proteína P102 na cepa patogênica 232 do que na cepa avirulenta J, sugerindo participação no processo de infecção.

A adesina P97 é considerada um importante fator de virulência devido a sua capacidade de aderência ao trato respiratório suíno. A adesão acontece pela ligação de uma sequência de aminoácidos repetidos presente na região R1 da proteína aos cílios (Hsu e Minion, 1998), sendo necessários um mínimo de oito aminoácidos para que a ligação ocorra (Minion, *et al.*, 2000). Nas cepas patogênicas 7448 e 232, esta adesina apresenta 9 e 15 repetições de aminoácidos na região R1, enquanto a cepa não patogênica J apresenta 10 repetições, demonstrando que o processo de

aderência do *M. hyopneumoniae* é multifatorial e não limita-se a esta proteína (Ferreira e Castro, 2007).

Conceição *et al.* (2006) demonstrou que uma vacina recombinante contendo a região R1 fusionada com a subunidade B da enterotoxina lábel de *Escherichia coli* pode induzir tanto resposta celular quanto humoral, estimulando produção de IgA na traquéia e brônquios de ratos. No entanto, resultados adicionais são necessários para investigar a eficácia desta quimera em suínos. Outro estudo também demonstrou que suínos vacinados com uma vacina de subunidade com a adesina P97 desenvolveram menor número de lesões pulmonares macroscópicas, indicando que a vacina reduziu a gravidade da resposta inflamatória e a quantidade de *M. hyopneumoniae* no trato respiratório em comparação com os animais não vacinados. No entanto, a vacina comercial (Suvaxyn[®] MH-ona) composta por bacterina foi mais eficiente na indução da resposta imune protetora do que a vacina testada (Okamba, *et al.*, 2010).

A proteína P216 foi caracterizada recentemente (Wilton, *et al.*, 2009), sendo processada, gerando as proteínas P120 e P85, as quais se encontram na superfície de *M. hyopneumoniae*. Além disso, esta proteína foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de animais convalescentes e experimentalmente infectados com a cepa patogênica 7448, o que indica sua expressão durante a infecção (Simionatto, *et al.*, 2010).

Simionatto *et al.* (2010) também demonstraram que as adesinas P102, P97, LPPT, os antígenos P46 e P95 e a proteína hipotética MHP0660 na forma recombinante são fortemente reconhecidas por soros convalescentes de suínos. Indicando que estas proteínas são expressas durante a infecção, o que as torna candidatos promissores para a formulação de vacinas.

Estudos proteômicos mostraram uma superexpressão das adesinas e/ou proteínas de superfície P46, P97 e P146 e da proteína hipotética MHP0662 (Pinto, *et al.*, 2009). Além disso, na cepa patogênica 7448 foram identificadas proteínas antigênicas já descritas anteriormente como P36, P46, P97 e NrdF e quatro novos antígenos, HSP70, EF-TU, pdhB e P76 . Os antígenos HSP70 e EF-TU em sua forma recombinante demonstraram eliciar respostas humorais em suínos com PE, o que sugere potencial diagnóstico (Pinto, *et al.*, 2007).

O sequenciamento dos genomas destas linhagens também possibilitaram a identificação de sistemas de exportação de proteínas nessa bactéria. O sistema de exportação é responsável pela inserção de proteínas na membrana ou exportação destas (Driessen e Nouwen, 2008). Esse processo é complexo e a última etapa da exportação da proteína-alvo ao seu destino é a retirada do peptídeo sinal (PS) feito por uma das duas sinal-peptidases: sinal-peptidase I, que cliva o PS da maioria das proteínas ou sinal-peptidase II, que processa o PS das lipoproteínas (Paetzel, *et al.*, 2002; Rusch e Kendall, 2007).

3.5. Sinal-peptidase I

A SPase I é uma serino-protease atípica de membrana e tem sido descrita como essencial às bactérias (Van Roosmalen, *et al.*, 2004). Devido a sua relação com a exportação de proteínas relacionadas com a patogenicidade das bactérias, a SPase I tem sido caracterizada como fator de virulência para várias espécies, como *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidemidis* (Bonnemain, *et al.*, 2004; Lammertyn, *et al.*, 2004; Kavanaugh, *et al.*, 2007; Bockstael, *et al.*, 2009). Por este motivo, e pelo envolvimento na viabilidade celular das bactérias, a Spase I vem sendo estudada como candidato promissor no

desenvolvimento de vacina (Rafati, *et al.*, 2006) e antibióticos (Paetzel, *et al.*, 2000; Roberts, *et al.*, 2007; Bockstael, *et al.*, 2009).

Em *M. hyopneumoniae*, a Spase I esta localizada no operon *sipS*, juntamente com a CDS correspondente a uma proteína hipotética (*MHP0030*) e às subunidades A (*gatA*), B (*gatB*) e C (*gatC*) da aspartil-tRNA/glutamil-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase. O fato de *gatA* ser super expressa em condição de infecção sugere coexpressão de *sipS* em níveis similares ao de *gatA* nessa condição (Moitinho-Silva, *et al.*, 2012).

Proteínas de membrana, adesinas, antígenos de superfície e proteína hipotéticas apresentam PS e provavelmente são processadas pela Spase I. Essa hipótese é aceitável pois a sinal-peptidase I apresenta expressão diferencial entre as três linhagens de *M. hyopneumoniae*, enquanto que as diferenças nas sequências das adesinas não justificariam o processamento proteolítico (Djordjevic, *et al.*, 2004).

Algumas características, como sequência de aminoácidos de baixa identidade com ortólogos pertencentes a outros micoplasmas e ausência de reação cruzada de soro anti-rSPase I com extratos de *M. flocculare* e *M. hyorhinis*, a indicam como um potencial antígeno diagnóstico (Moitinho-Silva, *et al.*, 2012). Em estudos recentes, a rMhSPase I se mostrou imunogênica para comundongos e antigênica para suínos foi demonstrada. A utilização desta proteína recombinante em um teste ELISA mostrou razoável concordância em relação ao ELISA-T, e as diferenças de resultados podem ser explicadas pela baixa sensibilidade (Erlandson *et al.*, 2005) e possibilidade de falsos positivos observados para o ELISA-T (Bereiter, *et al.*, 1990). No entanto, o potencial desse teste diagnóstico deve ser confirmado por mais experimentos.

A SPase I também apresenta potencial vacinal pois é expressa pelas três linhagens de *M. hyopneumoniae* estudadas, tendo possível localização na membrana e sendo imunogênica e antigênica (Moitinho-Silva, *et al.*, 2012). Desse modo, estudos para caracterizar imunologicamente esta proteína são essenciais para detalhar os mecanismos de ativação da resposta imune do hospedeiro.

4. Relatório de Estágio

4.1. Produção e purificação da proteína recombinante SPase I (rSPase I)

Para os ensaios de imunização dos camundongos, a CDS *sipS* foi previamente clonada no vetor pGEX 4T-3 para obtenção da proteína recombinante. O plasmídeo PGEX4T-3: *sipS* foi utilizado para expressar a rMhSPase I fusionada com glutathione-S-transferase (GST) em *E. coli* BL21 pLysE (Amersham Biosciences®). Após a cultura de *E. coli* atingir a densidade óptica (DO) de 0,5, foi feita a indução com 0,1mM de IPTG durante 6 h a 28°C sob agitação de 200 rpm. Após a indução, a cultura foi centrifugada e a solubilização da proteína foi realizada de acordo com Moitinho-Silva *et al.* (2012). A análise dos resultados foi realizado por eletroforese em SDS PAGE 12% e 15% corados com azul de Coomassie, o que mostra a recuperação da MhSPse I como um polipeptídeo de 18 kDa após a clivagem proteolítica. Este tamanho está de acordo com o esperado para rMhSPase I livre da fusão com GST , como mostra a figura 1. Após a quantificação, foram obtidos 30 mg de proteína purificada, quantidade suficiente para os ensaios de imunização dos camundongos.

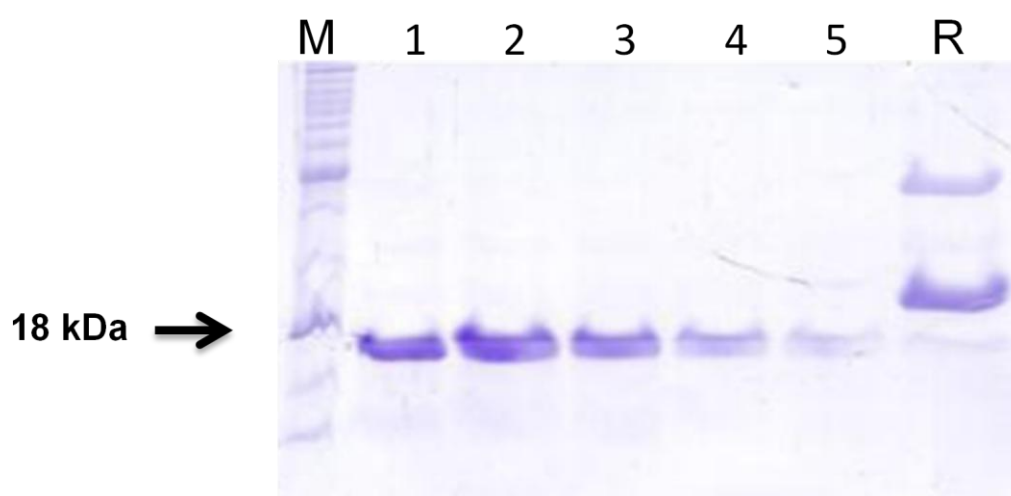


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose (SDS-PAGE 15%) para avaliação da purificação da rMhSPase I após a clivagem com trombina. Legenda: M – marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®); 1 ao 5 – Eluições rMhSPase I; R – Resina Gluthatione-Sepharose 4B.

4.2. Remoção de endotoxinas da proteína rSPase I

Proteínas de membrana recombinantes ao serem purificadas podem conter contaminação por endotoxinas da parede celular de bactérias gram-negativas, como a *E. coli*. Essas endotoxinas ativam a resposta imune celular podendo interferir no resultado de detecção de citocinas. Para a retirada das endotoxinas foi utilizada 1 mg de proteína livre de triton-X 100 em colunas Detoxi-Gel Endotoxin Removal (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram retiradas da coluna com cinco eluições de 1 mL de água apirogênica (LAL Reagent Water, Lonza). As eluições foram analisadas por SDS-PAGE 15%. A eficiência da remoção das endotoxinas foi avaliada pelo Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT Plus (Lonza®), de acordo com o fabricante. O protocolo de retirada das endotoxinas foi eficiente, pois restaram 4 EU/mL (EU = unidades de endotoxina), quantidade esta

considerada dentro dos limites toleráveis para produtos administrados parentalmente (5 Eu/kg), segundo a FDA, nos Estados Unidos.

4.3. Imunização dos camundongos

Para a avaliação da resposta imune humoral e celular, 12 camundongos BALB/c fêmeas de 90 dias de idade foram divididos em dois grupos distintos com seis indivíduos em cada grupo. O grupo 1 foi imunizado com a rMhSPase I purificada emulsionada com adjuvante de Freund. As imunizações foram feitas intraperitonealmente nos dias 0, 15 e 30, com 25 µg da proteína emulsionada em adjuvante de Freund completo na primeira imunização e incompleto nas duas últimas imunizações. O grupo 2 foi imunizado apenas com adjuvante completo de Freund na primeira imunização e incompleto nas duas últimas imunizações, nos mesmos dias do grupo 1. O sangue dos animais foi coletado através de punção do plexo venoso retro-ocular, sendo feito a cada 15 dias após as imunizações. Os animais foram sacrificados 60 dias após a primeira imunização.

4.4. Avaliação da resposta imune humoral induzida pela rSPase I

A resposta imune humoral induzida nos camundongos pela rMhSPase I foi avaliada por ELISA. Foram adsorvidos 300 ng por cavidade da rMhSPase I em placas de 96 cavidades em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), *overnight* a 4°C. Estas placas foram bloqueadas com solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado em PBS 1X por 1 h 30 min a 37°C. Logo após, foram adicionados os soros dos animais imunizados com rMhSPase I, diluídos 1: 20.000. Após, foi adicionado anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma®) por 1 h, seguido de solução substrato cromógena contendo peróxido de hidrogênio (0,1%) e OPD (Sigma®) em tampão citrato-fosfato pH 4,0 por 15 min a temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄. As lavagens dos poços foram

feitas com PBS-Tween 0,05% entre as etapas descritas. A leitura foi realizada a 492 nm em espectrofotômetro. Como controles negativos, foram utilizados os soros dos animais pré-ímmunes e dos animais imunizados somente com adjuvante de Freund. O *cut-off* foi calculado utilizando as médias das DO obtidas pelos animais sem tratamento mais dois desvios-padrão. O valor de *cut-off* calculado foi igual a 0,14. A produção de IgG anti-MhSPase I foi detectada no soro dos camundongos imunizados com o antígeno a partir dos primeiros 15 dias. A resposta foi considerada significativa, pois os valores de DO obtidos com os soros dos animais imunizados com o antígeno foram muito superiores ao *cut-off*, como mostrado na figura 2. Estes resultados permitiram caracterizar a rMhSPase I como uma proteína altamente imunogênica para camundongos.

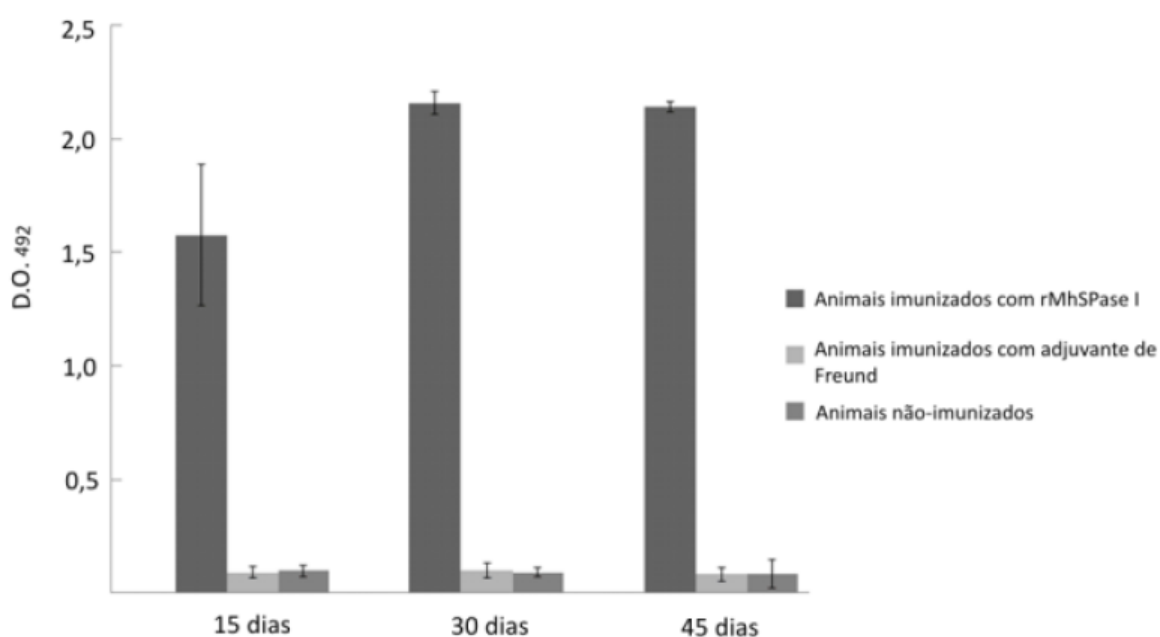


Figura 2: Detecção por ELISA indireto de IgG anti-rMhSPase I no soro de camundongos imunizados por ELISA. As barras indicam a média dos valores de DO obtidas nos três grupos de camundongos.

4.5. Avaliação da resposta imune celular através da detecção das citocinas interleucina-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4)

Para a avaliação da resposta imune celular, os camundongos imunizados foram sacrificados 60 dias após a primeira imunização para a retirada dos seus baços assepticamente. Os baços foram macerados em meio RPMI 1640 com 1% de soro fetal bovino e os eritrócitos foram lisados com uma solução de cloreto de amônio (0,15 M NH_4Cl ; 1 mM KHCO_3 ; 0,1 mM EDTA), figura 3. Os esplenócitos tiveram a sua viabilidade avaliada por *Trypan Blue* 0,4% e foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer. A cultura foi feita em placas de 24 cavidades contendo 5×10^6 células por cavidade em 0,5 mL de RPMI 164 com 10% de SFB e 50 μ M de 2-mercaptoetanol. As culturas foram estimuladas com 10 μ g/mL de rMhSPase I antes e após o tratamento para a remoção das endotoxinas, sendo que Concanavalina A (5 μ g/mL) e a ausência de estímulo foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. A cultura foi incubada a 37°C por 72h e 5% de CO_2 . Os sobrenadantes foram coletados por centrifugação e a detecção das citocinas interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interferon- γ (INF- γ) foi realizada através de ELISA utilizando o kit OptEIATM (BD Biosciences®) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de citocinas foram determinados através de curva padrão, sendo expressas em pg/mL (picogramas por mililitros).

Foi possível detectar as três citocinas testadas, sendo os níveis detectados para IL-4 e INF- γ similares, e altos níveis detectados para IL-10, mostrado na figura 4. Esses resultados sugerem que a rMhSPase I induz uma resposta imune do tipo Th2. Níveis elevados de IL-10 foram encontrados em suínos infectados com *M. hyopneumoniae* e outros micoplasmas (Thanawongnuwech e Thacker, 2003; Pang,

et al., 2011) e imunizados com uma linhagem atenuada (Li, *et al.*, 2012). Desse modo, esses dados sugerem que a SPase I pode estar envolvida no processo de ativação da resposta imune no hospedeiro. Este resultado pode estar relacionado também com a alta produção de anticorpos induzida pelas imunizações visto que respostas do tipo Th2 induzem a ativação de linfócitos B. No entanto, outras citocinas, como IL-6, IL-1 também já foram detectadas como envolvidas na infecção por *M. hyopneumoniae* (Damte, *et al.*, 2011; Woolley, *et al.*, 2012).



Figura 3: Maceração do baço para a obtenção dos esplenócitos dos camundongos imunizados.

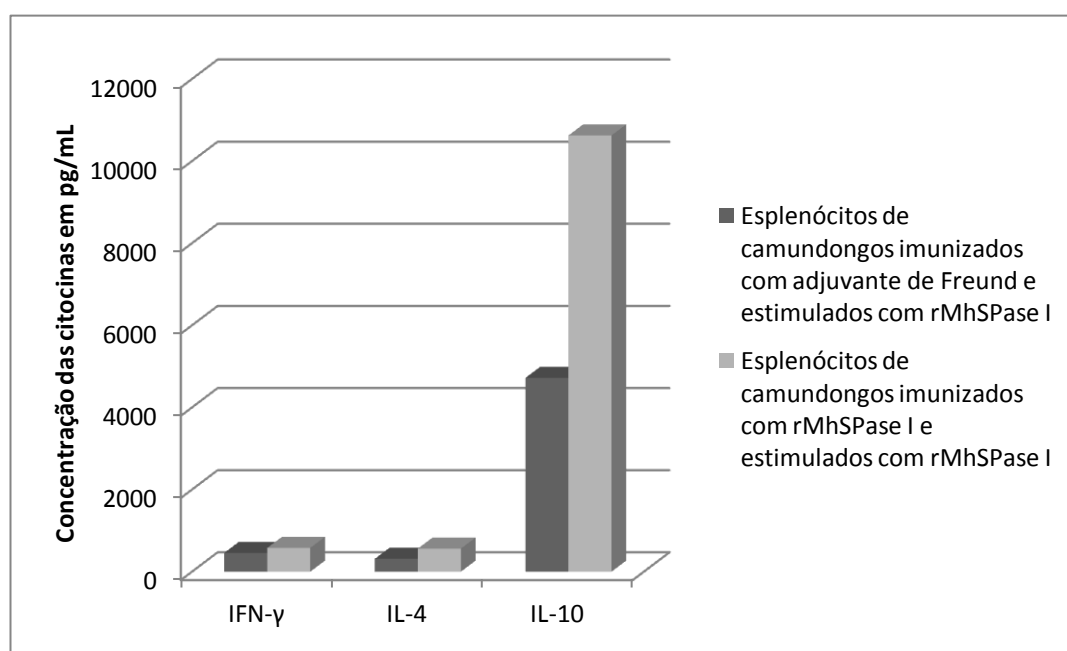


Figura 4: Detecção de citocinas nos sobrenadantes de esplenócitos estimulados com a rMhSPase I.

5. Outras atividades desempenhadas no período de estágio:

5.1. Extração de RNA de cultivo de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448 e *M. flocculare*

Em bactérias patogênicas, proteases podem ter um papel importante na virulência, agindo diretamente nas interações patógeno-hospedeiro ou permitindo a replicação bacteriana no ambiente do hospedeiro (Ingmer and Brøndsted, 2009). Para verificar a transcrição de três genes de proteases anteriormente anotados (Vasconcelos 2005), a primeira etapa do experimento foi a extração de RNA total de cultivos de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. As linhagens de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. flocculare* foram cultivadas de acordo com Pinto *et al.* (2009). O RNA total foi isolado a partir de 25 mL de cultivo de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* utilizando Trizol (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Contaminações por DNA genômico foram evitadas por meio de tratamento com

DNase (Thermo Scientific®). A quantificação foi feita por Quant-iT RNA Assay Kit e Qubit Fluorometer (Invitrogen®). A verificação da extração de RNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

A extração de RNA foi eficiente, pois foi possível observar a presença de bandas no tamanho esperado, do RNA ribossomal e RNA mensageiro, e a ausência de degradação, figura 5.

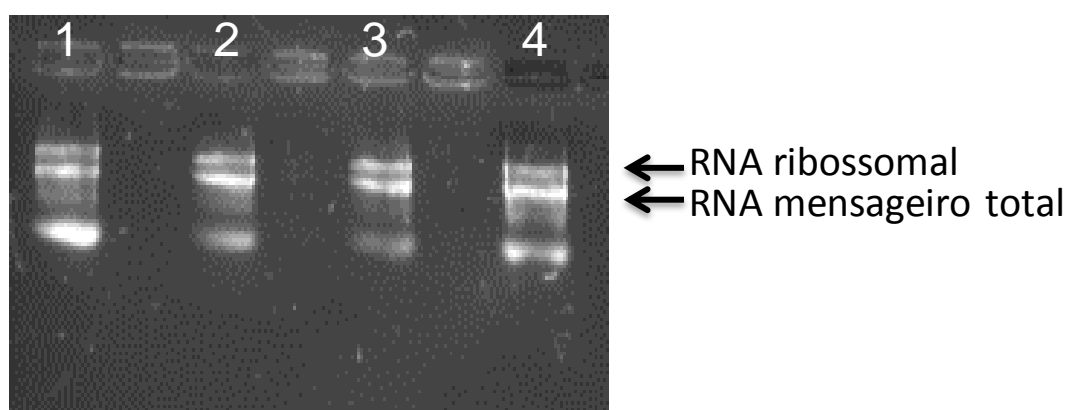


Figura 5: Avaliação do RNA de extraído de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* em gel de agarose 1,5%. Colunas 1 e 2 – RNA extraído de *M. hyopneumoniae* linhagem 7448; Colunas 3 e 4 – RNA extraído de *M. flocculare*

5.2. Reuniões semanais de grupo

Participação em reuniões semanais com o grupo de pesquisa do Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, para discussão de resultados alcançados nos experimentos e de artigos científicos da área.

5.3. Seminários de dados

Participação nos seminários de dados do Centro de Biotecnologia (CBiot) da UFRGS. Os seminários de dados são apresentações formais semanais dos

discentes (mestrandos e doutorandos) do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular para todo o centro de Biotecnologia, com o objetivo de relatar os resultados parciais de seus projetos de estudo.

5.4. Seminários do CBiot

Participação nos seminários do CBiot da UFRGS. Os seminários do centro são semanais e apresentados por professores do CBiot e/ou professores ou pesquisadores convidados de outras instituições de pesquisa para divulgação de seus temas de pesquisa.

6. Conclusões e Perspectivas

A forma recombinante da proteína de membrana sinal peptidase I de *M. hyopneumoniae* é altamente imunogênica e desencadeia uma resposta imune celular principalmente do tipo Th2, comprovada pela produção significativamente maior da citocina IL-10. Devido a estas características, a rMhSPase I pode ser um alvo para formulações vacinais contra a PES. Entretanto, a caracterização imunológica desta proteína em suínos é necessária para avaliar seu potencial protetor contra a PES.

As próximas etapas deste trabalho serão a realização de ensaios de imunização em suínos, a fim de analisar a resposta imune desenvolvida, bem como analisar novos adjuvantes que possam potencializar a resposta imune induzida pela proteína recombinante.

A realização deste estágio foi muito importante, pois pude aprofundar meus conhecimentos em biologia molecular e imunologia, principalmente em imunidade celular, na qual eu ainda não tinha contato. Este período também contribui na minha formação, tornando-me mais madura para novos aprendizados.

7. Referências Bibliográficas

BARRÉ, A.; DE DARUVAR, A.; BLANCHARD, A. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Database issue, p. D307-10, Jan 2004.

BEREITER, M.; YOUNG, T. F.; JOO, H. S.; ROSS, R. F. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. **Veterinary Microbiology**, v. 25, n. 2-3, p. 177-92, Nov 1990.

BOCKSTAEL, K.; GEUKENS, N.; VAN MELLAERT, L.; HERDEWIJIN, P.; ANNÉ, J.; VAN AERSCHOT, A. Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated infections of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 11, p. 3719-29, Nov 2009.

BONNEMAIN, C.; RAYNAUD, C.; RÉGLIER-POUPET, H.; DUBAIL, I.; FREHEL, C.; LETY, M. A.; BERCHE, P.; CHARBIT, A. Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1251-66, Mar 2004.

DAMTE, D.; LEE, S. J.; HWANG, M. H.; GEBRU, E.; CHOI, M. J.; LEE, J. S.; CHENG, H.; PARK, S. C. Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 4, p. 185-90, Jul 2011.

DESROSIERS, R. Transmission of swine pathogens: different means, different needs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 1-13, Jun 2011.

DJORDJEVIC, S. P.; CORDWELL, S. J.; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J.; MINION, F. C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2791-802, May 2004.

DRIESSEN, A. J.; NOUWEN, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 643-67, 2008.

FELD, N. C.; QVIST, P.; AHRENS, P.; FRIIS, N. F.; MEYLING, A.; A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 35-46, Jan 1992.

FERREIRA, H. B.; CASTRO, L. A. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 245-255, 2007.

GOODWIN, R. F. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. **Veterinary Record**, v. 116, n. 26, p. 690-4, Jun 1985.

HSU, T.; MINION, F. C. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Gene**, v. 214, n. 1-2, p. 13-23, Jul 1998.

JACQUES, M.; BLANCHARD, B.; FOIRY, B. C.; KOBISCH, M.; In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 23, n. 3, p. 239-47, 1992.

KAVANAUGH, J. S.; THOENDEL, M.; HORSWILL, A. R. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 780-98, Aug 2007.

LAMMERTYN, E.; VAN MELLAERT, L.; MEYEN, E.; LEBEAU, I.; DE BUCK, E.; ANNÉ, J.; GEUKENS, N. Molecular and functional characterization of type I signal

peptidase from *Legionella pneumophila*. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 5, p. 1475-83, May 2004.

LI, Y.; LI, P.; WANG, X.; YU, Q.; YANG, Q. Co-administration of attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 strain with bacterial DNA enhances the local and systemic immune response after intranasal vaccination in pigs. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2153-8, Mar 2012.

LIU, W.; FENG, Z.; FANG, L.; ZHOU, Z.; LI, Q.; LI, S.; LUO, R.; WANG, L.; CHEN, H.; SHAO, G.; XIAO, S. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 168. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 4, p. 1016-1017, Feb 2011.

MACHADO, C. X.; PINTO, P. M.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H₂O₂ detoxification. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 10, p. 3411-9, Oct 2009.

MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; LEIN, A.; VRIJENS, B.; de KRUIF, A. The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 45, n. 8, p. 495-505, Oct 1998.

MAES, D.; SEGALÉS, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 297-309, Jan 2008.

MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 104-9, Sep 1996.

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, n. 49-50, p. 7081-6, Nov 2006.

MINION, F. C.; ADAMS, C.; HSU, T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 3056-60, May 2000.

MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M.; MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7123-33, Nov 2004.

MOITINHO-SILVA, L.; HEINECK, B. L.; REOLON, L. A.; PAES, J. A.; KLEIN, C. S.; REBELATTO, R.; SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. *Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 3-4, p. 282-91, Jan 2012.

NICOLET, J.; PAROZ, P.; BRUGGMANN, S. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. **Research in Veterinary Science**, v. 29, n. 3, p. 305-9, Nov 1980.

OKAMBA, F. R.; ARELLA, M.; MUSIC, N.; JIA, J. J.; GOTTSCHALK, M.; GAGNON, C. A. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine**, v. 28, n. 30, p. 4802-9, Jul 2010.

OPRIESSNIG, T.; GIMÉNEZ-LIROLA, L. G.; HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 133-48, Dec 2011.

PAETZEL, M.; DALBEY, R. E.; STRYNADKA, N. C. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. **Pharmacology Biochemistry and Behavior Ther**, v. 87, n. 1, p. 27-49, Jul 2000.

PAETZEL, M.; KARLA, A.; STRYNADKA, N. C.; DALBEY, R. E. Signal peptidases. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4549-80, Dec 2002.

PANG, H. X.; QIAO, H. M.; CHENG, H. J.; ZHANG, Y. F.; LIU, X. J.; LI, J. Z. [Levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid in children with *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*]. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v. 13, n. 10, p. 808-10, Oct 2011.

PINTO, P. M.; CHEMALE, G.; de CASTRO, L. A.; COSTA, A. P.; KICH, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 83-93, Mar 2007

PINTO, P. M.; KLEIN, C. S.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Proteome Science**, v. 7, p. 45, 2009.

RAFATI, S.; GHAEMIMANESH, F.; ZAHEDIFARD, F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 24, n. 16, p. 3290-7, Apr 2006.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-156, Dec 1998.

ROBERTS, T. C.; SMITH, P. A.; CIRZ, R. T.; ROMESBERG, F. E. Structural and initial biological analysis of synthetic arylomycin A2. **J Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 51, p. 15830-8, Dec 2007.

ROSS, R. F.; YOUNG, T. F. The nature and detection of mycoplasmal immunogens. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 3-4, p. 369-80, Nov 1993.

RUSCH, S. L.; KENDALL, D. A. Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. **Biochemistry**, v. 46, n. 34, p. 9665-73, Aug 2007.

SACRISTAN, R. D.; RODRÍGUEZ, A.L.; SIERENS, A.; VRANCKX, K.; BOYEN, F.; DEREU, A.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D.G. Efficacy of in-feed medication with chlortetracycline in a farrow-to-finish herd against a clinical outbreak of respiratory disease in fattening pigs. **Veterinary Record**. [Epub ahead of print], Nov 2012.

SIBILA, M.; NOFRARÍAS, M.; LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; VALERO, O.; ESPINAL, A.; CALSAMIGLIA, M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 97-107, May 2007.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 221-31, Sep 2009.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 317-20, Dec 2004.

THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, E. L. Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. **Viral Immunology**, v. 16, n. 3, p. 357-67, 2003.

VAN ROOSMALEN, M. L.; GEUKENS, N.; JONGBLOED, J. D.; TJALSMA, H.; DUBOIS, J. Y.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M.; ANNÉ, J. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, n. 1-3, p. 279-97, Nov 2004.

VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V.; BONATTO, S.L.; CARVALHO, M.O.; PINTO, P.M.; ALMEIDA, D.F.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.; ASSUNÇÃO, E.N.; AZEVEDO, V.A.; BOGO, M.R.; BRIGIDO, M.M.; BROCCHI, M.; HELIO, A.B.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, S.S.; CAREPO, M.S.; CARRARO, D.C.; DE 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.; FALCÃO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.A.; FRÍAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARÃES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.A.; LOPES, M. I.; LORETO, E.L.S.; MADEIRA, H.M.F.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.B.; MOREIRA, M.A.M.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.O.; NICOLA'S, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXÃO, R.F.C.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.J.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.M.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.C.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.A.; SOUZA, K.R.L.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS,

M.B.R.; TEIXEIRA, S.M.R.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J.H.; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5568-77, Aug 2005.

VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; de KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4470-2, Nov 2004.

WILSON, S.; VAN BRUSSEL, L.; SAUNDERS, G.; TAYLOR, L.; ZIMMERMANN, L.; HEINRITZI, K.; RITZMANN, M.; BANHOLZER, E.; EDDICKS, M. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. **Vaccine**, Oct 2012.

WILTON, J.; JENKINS, C.; CORDWELL, S. J.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; ONEAL, D. C.; DJORDJEVIC, M. A.; CONNOLLY, A.; BARCHIA, I.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. PMhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 566-82, Feb 2009.

WOOLLEY, L. K.; FELL, S.; GONSALVES, J. R.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P.; JENKINS, C.; EAMENS, G. J. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 1-2, p. 186-95, Dec 2012.

ZIELINSKI, G. C.; ROSS, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 8, p. 1262-9, Aug 1993.