

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Expressão heteróloga, purificação e caracterização de
proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Silvana Beutinger Marchioro

Pelotas, 2008

SILVANA BEUTINGER MARCHIORO

Expressão heteróloga, purificação e caracterização de proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biologia Molecular).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M317e

Marchioro, Silvana Beutinger

Expressão heteróloga, purificação e caracterização de proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* / Silvana Beutinger Marchioro ; **orientador Odir Antônio Dellagostin. – Pelotas, 2008. – 56f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.**

1.Biotecnologia. 2.Mycoplasma hyopneumoniae. 3.PES. 4.Vacinas. 5.Proteínas recombinantes. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Título.

CDD: 574.88

Banca examinadora:

Dr. Éverton Fagonde da Silva, Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Fabrício Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao meu orientador, Prof. Odir Antônio Dellagostin, pela oportunidade e orientação dispensada para a realização deste trabalho, contribuindo na minha formação profissional.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, força, confiança e apoio em todas as etapas de minha vida, grandes responsáveis pela minha formação pessoal.

Ao Paulo, que mesmo distante se fez sempre presente. Por todo amor, carinho e apoio em todas as minhas decisões.

À Simone, pela excelente amizade, e também por todo auxílio, dicas e orientações para realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular, André, Clarice, Daiane, Danieli, Éverton, Fabiana, Gustavo, Marcelo, Michel, Michele, Ronaldo, Samuel, Sandra, Sibebe, Vanessa e Vanusa, pela amizade, auxílio, e por tornarem o ambiente de trabalho agradável.

Aos demais, colegas, amigos e professores do Centro de Biotecnologia, pela acolhida e por todo o carinho.

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

Muito Obrigada.

RESUMO

MARCHIORO, Silvana Beutinger. **Expressão heteróloga, purificação e caracterização de proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), uma das doenças respiratórias de suíno mais comum em todo o mundo. Ela é caracterizada por retardo no desenvolvimento em animais na fase de crescimento e terminação, causando perdas econômicas consideráveis na indústria suinícola. A vacinação parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES, entretanto, as vacinas contra a doença disponíveis no mercado apresentam um elevado custo de produção e conferem uma proteção parcial, não impedindo o estabelecimento da infecção e nem a presença de suínos portadores. Desta forma, surge à necessidade da utilização de novas estratégias visando contornar este problema. A tecnologia do DNA recombinante constitui uma ferramenta importante para o desenvolvimento de vacinas. As publicações das seqüências de três genomas de *M. hyopneumoniae*, duas cepas patogênicas (232 e 7448) e uma não patogênica (J) estão contribuindo com pesquisas e, acelerando o processo de identificação de novas proteínas imunogênicas. A partir dos dados gerados e da análise proteômica complementar, foi possível a identificação de seqüências codificadoras (CDS) de proteínas transmembrana. Estas seqüências foram clonadas e expressas em *E. coli*. Um total de sete proteínas recombinantes foram purificadas e avaliadas quanto à imunogenicidade em camundongos e à antigenicidade frente a soros de suínos com PES. Todas as proteínas avaliadas foram capazes de induzir uma resposta imune significativa em camundongos. O estudo das propriedades antigênicas revelou que estas são reconhecidas pelo soro de suínos infectados com *M. hyopneumoniae*. As proteínas recombinantes avaliadas neste estudo poderão ser de valia para utilização como vacinas de subunidade e em testes de imunodiagnóstico da PES.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, PES, vacina, proteína recombinante.

ABSTRACT

MARCHIORO, Silvana Beutinger. **Heterologous expression, purification and characterization of transmembrane protein of *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of swine enzootic pneumonia (EP), one the most common respiratory diseases of pigs worldwide. The disease is characterized by retarded growth rate in animals of mid-finishing to slaughter age, causing significant economic losses to swine production. Vaccination is the most cost-effective strategy for the control of this disease. However, the vaccines against the disease available on the market have a high production cost and only offer partial protection, not preventing the establishment from infection and the presence of pigs carriers. This issue highlights the need for the use of new strategies aiming at circumventing this problem. The recombinant DNA technology is an important tool for the development of vaccines. The publication of the sequence of three genomes of *M. hyopneumoniae*, two pathogenic strains (232 and 7448) and a non-pathogenic (J) is helping the researches, and accelerating the process of identification of new antigenic proteins. From the sequence data and proteomic analysis, it was possible to identify coding sequences (CDS) of transmembrane proteins. These antigens were cloned and expressed using *E. coli* as an expression system. A total of seven recombinant proteins were purified and evaluated regarding immunogenicity in mice and antigenicity with sera from animals with EP. All the antigens evaluated were able to induce a significant immune response in mice. The evaluation of antigenicity properties revealed the proteins reacted with sera from pigs infected with *M. hyopneumoniae*. The recombinant proteins evaluated in this study may be of value to use in the development of vaccines and tests for immunodiagnosis of swine enzootic pneumonia.

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, swine enzootic pneumonia, vaccine, recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gel de poliacrilamida 12% corado com <i>Comassie Blue</i> mostrando as sete proteínas recombinantes purificadas.....	33
Figura 2	Resposta imune humoral produzida pelos animais inoculados com as proteínas recombinantes e do grupo controle negativo (salina/Al(OH) ₃).....	34
Figura 3	Resposta de IgG anti <i>M. hyopneumoniae</i> nos soros de camundongos inoculados com as proteínas recombinantes utilizando ELISA com extrato de células.....	35
Figura 4	<i>Western blot</i> demonstrando a reatividade das proteínas recombinantes com soro de suíno naturalmente infectado.....	36
Figura 5	Avaliação antigênica por ELISA das proteínas recombinantes contra soro de suíno naturalmente infectado	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação das CDS selecionadas e seqüências dos <i>primers</i>	27
Tabela 2	Identificação dos alvos, região amplificada, tamanho e resultados obtidos.....	32
Tabela 3	Reatividade das proteínas recombinantes frente aos soros suínos.	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Pneumonia enzoótica Suína (PES)	10
1.2 Vacinas.....	14
2. OBJETIVOS.....	20
3. ARTIGO	21
RESUMO	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	41
4. CONCLUSÃO	46
5. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pneumonia Enzoótica Suína (PES)

Um dos maiores problemas enfrentados pela suinocultura industrial, em âmbito mundial, são as enfermidades que acometem o sistema respiratório destes animais (STAKENBORG et al., 2005). A pneumonia enzoótica suína está entre as doenças respiratórias multifatoriais de maior destaque na indústria suinícola, pois é altamente prevalente e acarreta consideráveis perdas econômicas tanto aos produtores quanto para indústria. Estas perdas estão relacionadas principalmente com o aumento do uso de medicamentos e ao decréscimo da performance dos suínos (MAES et al., 2008).

A PES é uma doença respiratória crônica que afeta mais de 80% dos suínos em todo mundo, caracterizada por uma alta morbidade baixa mortalidade. A tosse crônica e não produtiva, o retardo nas taxas de crescimento e a ineficiente conversão alimentar caracterizam a doença (ROSS, 1999). Embora animais de todas as idades sejam susceptíveis, a doença não é comumente observada em animais com menos de 6 semanas de idade, sendo os animais na fase de crescimento e terminação os mais comprometidos (SIBILA et al., 2008). No entanto, em rebanhos sem imunidade, a doença pode afetar leitões já a partir de duas semanas de idade, bem como animais em fase de reprodução (STÄRK, 2000).

1.1.2 Etiopatogênia

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico responsável pela pneumonia enzoótica suína. Além dele, outros patógenos como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Arcanobacterium pyogenes* são também frequentemente envolvidos na doença (THACKER, 2006). Mare & Switzer (1965) e Goodwin et al. (1965) foram os primeiros a descrever o isolamento do agente de pulmões e reproduzir experimentalmente a doença (apud ROSS, 1999).

Embora fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* não têm sido caracterizados, a aderência do organismo no epitélio respiratório é reconhecida como um importante passo na colonização e infecção (ROSS, 1999). *M. hyopneumoniae* infecta células epiteliais da traquéia, brônquios e bronquíolos, aderindo-se aos cílios e promovendo uma redução na atividade ciliar, com danos e perdas dos cílios, conseqüentemente

1 resultando em um decréscimo nos mecanismos de defesa natural do trato
2 respiratório do hospedeiro (DEBEY; ROSS, 1994). O fator responsável pela
3 aderência melhor caracterizado é a adesina designada como P97, primeiramente
4 descrita por ZHANG et al. (1995), a qual reconhece receptores presentes nos cílios
5 das células epiteliais respiratórias dos suínos. No entanto, limitadas informações
6 estão disponíveis sobre os mecanismos que causam o dano ciliar. *M. hyopneumoniae*
7 pode aumentar a concentração intracelular de cálcio livre nas células do epitélio
8 ciliar, induzindo a perda de cílio (PARK et al., 2002). Danos nas células do epitélio
9 ciliar podem também ser causados por produtos tóxicos do metabolismo dos
10 micoplasmas como peróxido de hidrogênio e os radicais superóxidos (RAZIN et al.,
11 1998).

12 Depois de colonizar, a multiplicação do *M. hyopneumoniae* em pulmões de
13 suínos resulta em pneumonia caracterizada por infiltrado celular de macrófagos,
14 neutrófilos e linfócitos (MEYNS et al., 2006). Tem sido proposto que os macrófagos
15 alveolares participam do início da resposta inflamatória logo após a infecção,
16 expressando IL-1 e TNF- α (CHOI et al., 2006). Citocinas inflamatórias são
17 importantes mediadores tanto da defesa pulmonar quanto da inflamação. Um dos
18 principais efeitos comum aos micoplasmas é habilidade de induzir a liberação de
19 citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelas lesões pulmonares (RODRIGUEZ et
20 al., 2004). Os micoplasmas são também capazes de estimular excessivo número de
21 células T pela exposição de vários epítomos simultaneamente (RIBEIRO et al.,
22 2004). Assim, a patogênese da pneumonia enzoótica suína é dependente não
23 somente do dano causado ao cílio diretamente pelo organismo, mas também é
24 dependente do efeito do sistema imune do hospedeiro (CHOI et al., 2006).

25 *M. hyopneumoniae* é capaz de escapar das defesas naturais do hospedeiro
26 fixando-se firmemente à sua mucosa respiratória. Sua localização no lúmen pode
27 explicar a dificuldade de eliminação do agente pelos mecanismos de defesa do
28 hospedeiro e por tratamentos antimicrobianos (SOBESTIANSKY et al., 2001), além
29 da sua habilidade de mimetizar várias superfícies antigênicas e utilizar-se dessa
30 variação para evadir-se do sistema imune. Eles utilizam a maquinaria genética para
31 alterar antígenos de superfície através da variação de fase, da variação do tamanho
32 e do mascaramento de epítomos de proteínas de superfície. Dessa forma, estes
33 microrganismos conseguem desviar a resposta imune do hospedeiro e estabelecer a
34 infecção crônica (RAZIN et al., 1998).

1 Recente avaliação no genoma de três cepas (7448, J e 232) de *M.*
2 *hyopneumoniae* (VASCONCELOS et al., 2005; MINION et al., 2004), revelou a
3 presença de um provável elemento integrativo conjugativo (ICE) presente nas duas
4 cepas patogênicas (7448 e 232) e ausente na cepa não patogênica (J). Os
5 resultados sugerem que o ICE é um DNA móvel e provavelmente envolvido em
6 eventos de recombinação genética e na patogenicidade deste patógeno (PINTO et
7 al., 2007).

8 Embora *M. hyopneumoniae* seja considerado principalmente um patógeno
9 respiratório, recentes estudos tem descrito seu isolamento de órgãos internos,
10 podendo ocorrer disseminação pela via linfática ou sangüínea (MAROIS et al.,
11 2007). O agente foi re-isolado a partir do fígado, baço e rins de suínos
12 experimentalmente (LE CARROU et al., 2006) e naturalmente infectados. No
13 entanto, essa disseminação parece ser transitória e provavelmente não participa do
14 desenvolvimento da PES (MAROIS et al., 2007).

15 16 **1.1.3 Diagnóstico**

17 Sinais clínicos e a presença de lesões são utilizados como diagnóstico
18 presuntivo da PES, no entanto testes laboratoriais são necessários para o
19 diagnóstico conclusivo. Embora a cultura do *M. hyopneumoniae* seja descrita como
20 padrão ouro, a mesma não é utilizada como rotina de diagnóstico (SIBILA et al.,
21 2008), pois seu cultivo e isolamento de suínos naturalmente ou experimentalmente
22 infectados são limitados, por se tratar de um microorganismo fastidioso, consumindo
23 tempo, e frequentemente não sendo bem sucedidos (THACKER, 2006). Além da sua
24 característica fastidiosa, seu isolamento torna-se difícil devido a contaminação
25 freqüente de outros micoplasmas: *Mycoplasma hyorhinis*, presente no trato respiratório
26 suíno, causador de poliserosites e artrites; bem como de *Mycoplasma flocculare*,
27 espécie não-patogênica que apresenta semelhanças em relação à morfologia,
28 crescimento e antigenicidade ao *M. hyopneumoniae* (ROSS, 1999). Essas dificuldades,
29 muitas vezes, tornam o diagnóstico por cultivo não exeqüível (THACKER, 2004).

30 Os testes sorológicos são os mais comumente utilizados para diagnosticar a
31 PES. Detecção de anticorpos para *M. hyopneumoniae* pode ser realizada por ELISA e,
32 menos freqüentemente pelo teste de fixação do complemento. ELISA é um método
33 automatizado rápido e barato que fornece informações úteis quanto à presença de
34 anticorpos derivados maternalmente 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). No entanto, estudos comparativos reportaram divergências quanto à sensibilidade e especificidade destes kits (SORENSEN et al., 1997; STRAIT et al., 2004; ERLANDSON et al., 2005). No Brasil, o diagnóstico da PES é, usualmente, feito pelo teste de ELISA padronizado no Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPISA), utilizando antígenos extraídos da superfície dos micoplasmas com Tween-20 (ELISA-T) (PIFFER et al., 1998).

As técnicas de anticorpo fluorescente (FA) e imunoistoquímica (IHC) são utilizadas para identificação de *M. hyopneumoniae* em tecidos, ou em esfregaços de lâminas. No entanto, esta técnica tem a desvantagem de que o diagnóstico pode somente ser feito *post-mortem* (SIBILA et al., 2008).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido descrita como a técnica mais sensível para detecção de infecções causadas pelo *M. hyopneumoniae* (CALSAMIGLIA et al., 1999). A técnica de PCR apresenta diversas vantagens sobre os métodos atuais para detecção e o diagnóstico do agente devido a sua sensibilidade, especificidade e rapidez (THACKER, 2004). No entanto sua utilização tem sido preferencialmente para o monitoramento da infecção no rebanho não em animais individualmente (OTAGIRI et al., 2005), pois o DNA do *M. hyopneumoniae* pode ser amplificado tanto de bactérias vivas ou mortas e, a identificação de animais com PCR positivo deixa dúvida se esses suínos têm a infecção ou são simplesmente portadores (SIBILA et al., 2008).

1.1.4 Controle

O controle da infecção por *M. hyopneumoniae* pode ser realizado de diferentes maneiras dentre as quais se destacam: boas práticas de manejo e nas condições de alojamento, o uso de antimicrobianos e a vacinação dos animais (MAES et al., 2008).

As melhorias nas práticas de manejo são primordiais para o controle de infecções por *M. hyopneumoniae*, e deve ser a primeira medida a ser tomada. Instituir mudanças relacionadas aos: sistemas de produção *all-in*, *all-out*, cuidados especiais na compra de novos animais, tamanho do rebanho, controle de outras doenças, assim como práticas de biossegurança, podem reduzir a disseminação do agente,

1 diminuir o dano pulmonar por outros patógenos e levar a um considerável aumento
2 no controle da PES (MAES et al., 2008).

3 Embora vacinas que reduzam as conseqüências da infecção estejam
4 disponíveis, a medicação com antimicrobianos na comida ou na água ainda é uma
5 prática comum (VICCA et al., 2004). Antimicrobianos como tetraciclina e
6 macrolídeos são freqüentemente usados no tratamento de doenças respiratórias
7 como a PES (MAES et al., 2008). Suínos tratados com alguns antimicrobianos
8 tiveram um melhor desempenho e redução nos sinais clínicos e nas lesões
9 pulmonares (VICCA et al., 2005). Porém, a medicação contínua ou por longos
10 períodos pode aumentar o risco do desenvolvimento de resistência, além de haver
11 um possível risco de resíduos de antimicrobianos nas carcaças de suínos ao abate
12 (LE GRAND; KOBISCH, 1996).

13 Além das práticas citadas, tem se tentado um controle maior da doença
14 através da eliminação de animais infectados e através da imunização do rebanho.
15 No entanto, a vacinação parece ser a forma mais efetiva e economicamente viável
16 de controlar a PES (LIN et al., 2003).

18 **1.2 Vacinas**

19 Vacinas comerciais tem sido uma importante ferramenta para controlar
20 infecções por *M. hyopneumoniae*, e são largamente utilizadas no mundo todo. As
21 vacinas comerciais são constituídas de preparados de células inteiras inativadas
22 (bacterinas) e administradas com adjuvantes. A maior vantagem da vacinação inclui
23 o aumento do ganho de peso diário (2-8%) e da conversão alimentar (2-5%), a
24 diminuição do tempo para alcançar o peso de abate, a redução de sinais clínicos e
25 das lesões pulmonares, além de diminuir os custos com tratamento (MAES et al.,
26 1999). Mas para a obtenção de resultados desejáveis, a vacinação deve ser
27 praticada em combinação com outros fatores de manejo (HAESEBROUCK et al.,
28 2004).

29 O mecanismo exato de proteção conferido por estas bacterinas não está
30 totalmente esclarecido, alguns estudos sugerem que os anticorpos de mucosa e
31 resposta imune sistêmica mediada por células, são importantes no controle da
32 doença (THACKER et al., 2000). Porém, não existe uma correlação direta entre a
33 vacina e a indução de níveis de anticorpos no soro e proteção (DJORDJEVIC et al.,
34 1997; THAKER et al., 1998). Bem como, uma contradição sobre a vacinação de

1 leitões. Enquanto alguns estudos sugerem a importância de determinar os níveis de
2 anticorpos maternos presentes antes da vacinação, os quais parecem ser protetores
3 para os leitões jovens, mas ao mesmo tempo, parecem inibir a formação de uma
4 resposta imune ativa (HODGINS et al., 2004). Para outros, a vacinação dos leitões
5 pode ser feita já na primeira semana de vida, independente do nível de imunidade
6 das porcas (MARTELLI et al., 2006).

7 Apesar de suas vantagens, estas vacinas conferem apenas uma proteção
8 parcial, não prevenindo a colonização (HAESEBROUCK et al., 2004), mas reduzindo
9 o número de organismos no trato respiratório (MEYNS et al., 2006), e diminuindo a
10 infecção no rebanho (SIBILA et al., 2007). Porém, apenas uma redução limitada e
11 não significativa na transmissão deste agente foi obtida. Estes achados reforçam a
12 idéia de que só a vacinação não é suficiente para eliminar o *M. hyopneumoniae* de
13 rebanhos de suínos infectados (MEYNS et al., 2006).

14 Embora a vacinação confira efeitos benéficos na maioria dos rebanhos,
15 alguns fatores influenciam na sua eficácia, tornando estes efeitos variáveis. Fatores
16 como condições de estocagem de vacinas impróprias, diferenças antigênicas entre
17 cepas de campo e vacinais, a presença da doença no momento da vacinação, e a
18 interferência da resposta imune induzida pela vacina por anticorpos derivados
19 maternoalmente, podem influenciar a eficácia da vacinação (MAES et al., 2008).
20 Diferenças na virulência entre os isolados de campo de *M. hyopneumoniae* têm sido
21 demonstradas (VICCA et al., 2003), bem como uma alta heterogeneidade
22 proteômica entre estes isolados (CALUS et al., 2007).

23 24 **1.2.1 Vacinologia reversa**

25 Nos últimos anos tem sido notável a expansão de novas abordagens que estão
26 disponíveis para identificação de componentes antigênicos relevantes para uso em
27 vacinas, e estas novas técnicas estão começando a ser aplicadas no
28 desenvolvimento de vacinas veterinárias (MOVAHEDI; HAMPSON, 2008).
29 Progressos na microbiologia, biologia molecular, imunologia e bioinformática têm
30 levado a uma abordagem mais racional no desenvolvimento de vacinas
31 (HAESEBROUCK et al., 2004). O método tradicional de preparação de vacinas, o
32 qual segue os princípios estabelecidos por Pasteur, vêm sendo substituído. Com a
33 tecnologia do DNA recombinante, a “segunda geração” de vacinas surgiu baseada
34 no uso de proteínas recombinantes. E mais recentemente, com a disponibilidade de

1 seqüências completas de genomas, têm levado a uma nova abordagem no
2 desenvolvimento de vacinas (SCARSELLI et al., 2005), e uma “terceira geração” de
3 vacinas está surgindo (MOVAHEDI; HAMPSON, 2008), a qual vem sendo
4 denominada de vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2000).

5 O paradigma básico da produção de vacinas desenvolvido por Pasteur, que
6 inclui o isolamento, inativação ou atenuação, e injeção do microrganismo
7 patogênico, guiou o desenvolvimento de vacinas durante quase todo o século vinte.
8 E muitas destas vacinas têm demonstrado eficácia no controle de um importante
9 número de doenças infecciosas (SERRUTO; RAPPUOLI, 2006). No entanto,
10 algumas limitações dificultam a preparação de vacinas pelo método tradicional.
11 Estas limitações incluem: a dificuldade de cultivo de alguns patógenos; a
12 necessidade de meios especiais, tornando o cultivo oneroso; sistemas de
13 biossegurança para prevenir exposições a microorganismos patogênicos; reversão à
14 doença por uma atenuação insuficiente do patógeno; e pelo tempo consumido para
15 o desenvolvimento de vacinas atenuadas, podendo levar décadas até chegar ao
16 produto final (GLICK; PASTERNAK, 1998).

17 Nos últimos anos, a disponibilidade de seqüências inteiras de genomas tem
18 mudado plenamente a metodologia utilizada para o desenvolvimento de vacinas, e
19 introduzido uma nova maneira de pensar este processo (RAPPUOLI, 2001). Este
20 aumento no número de genomas tem induzido a aplicação da vacinologia reversa
21 principalmente para patógenos dos quais a vacinologia clássica têm falhado (MORA
22 et al., 2006). Porém a o seqüenciamento de um ou dois genomas por espécie nem
23 sempre são suficientes, com a variabilidade genética existente entre algumas cepas,
24 muitas vezes, se faz necessário o seqüenciamento de um maior número de isolados
25 para entender melhor a base destas espécies (MORA et al., 2005).

26 A combinação da análise *in silico* de toda a seqüência do genoma e a
27 tecnologia do DNA recombinante tem fornecido uma serie de avanços no
28 desenvolvimento da terceira geração de vacinas (MOVAHEDI; HAMPSON, 2008). O
29 processo inicia na seqüência do genoma, e por análises computacionais, é possível
30 prever quais antígenos serão mais promissores como candidatos a vacina
31 (RAPPUOLI, 2001). Através desta análise são selecionadas todas as proteínas
32 virtualmente importantes que o patógeno pode expressar tanto *in vivo* quanto *in*
33 *vitro*, sem prévio conhecimento da sua abundância, imunogenicidade ou expressão
34 durante a infecção (MOVAHEDI; HAMPSON, 2008). Depois da seleção de um grupo

de genes do genoma, os passos seguintes são: clonagem e expressão destes genes selecionados, purificação das proteínas recombinantes, ensaios *in vitro* e *in vivo* para identificação dos possíveis candidatos a proteção (GRANDI, 2001).

Uma série de patógenos já teve seu genoma analisado na busca de alvos potenciais para uso diagnóstico e desenvolvimento de vacinas. Dentre eles podemos citar: o grupo B de *Meningococcus*, grupo B de *Streptococcus agalactiae*, *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, vírus da hepatite C, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, entre outros (RAPPUOLI, 2000; SERRUTO et al., 2004; GAMBERINI et al., 2005; KOIDE et al., 2005; MAIONE et al., 2005). Alguns exemplos da utilização da vacinologia reversa nas vacinas veterinárias bacterianas incluem sua aplicação no agente etiológico do *footrot* ovino, *Dichelobacter nodosus* (MYERS et al., 2007), e para *Pasteurella multocida*, agente da cólera aviária (AL-HASANI et al., 2007).

O seqüenciamento do genoma de três cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005), tem permitido a escolha racional de seqüências que codificam proteínas para avaliação e caracterização de imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina protetora e para o uso em testes diagnósticos da PES. O genoma pequeno deste agente bem como, o número limitado de proteínas secretadas ou de superfície, favorece a utilização da vacinologia reversa. Pesquisas com novas abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o desenvolvimento de vacinas mais eficientes no controle da doença, incluindo vacinas de subunidade e de DNA.

1.2.2 Vacinas Recombinantes de Subunidade

A tecnologia do DNA recombinante, associada à abordagem da vacinologia reversa, têm fornecido ferramentas valiosas para a produção de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* em sistemas heterólogos. As quais podem ser alternativas para utilização em vacinas contra PES mais eficientes, substituindo as atuais que apresentam elevado custo de produção devido à dificuldade no cultivo do agente (KOBISCH; FRIIS, 1996).

As proteínas recombinantes heterólogas podem ser produzidas tanto em organismos procariotos como em eucariotos e, uma vez expressas, podem ser rapidamente purificadas e administradas aos animais em altas concentrações (CLARK; CASSIDY-HANLEY, 2005). *E. coli* é um dos mais atrativos sistemas

utilizados para a produção de proteínas recombinantes (BANEYX, 1999). No entanto, apesar das características genéticas da *E. coli* serem bem conhecidas, nem todo o gene pode ser expresso eficientemente neste microrganismo (WEICKERT et al., 1996). Um exemplo é a expressão de genes de *M. hyopneumoniae* contendo códons TGA, pois o mesmo não utiliza o código genético universal (RAZIN et al., 1998). Esta característica tem dificultado a expressão destes genes em *E. coli*, já que TGA codifica para o aminoácido triptofano em micoplasmas e é códon de terminação nos demais organismos. Mutações pontuais capazes de substituir o TGA por TGG tem sido a estratégia utilizada para contornar este problema. SIMIONATTO et al. (2006) descreveram a otimização de um protocolo de PCR para a mutação sítio dirigida no códon TGA de genes de *M. hyopneumoniae*, obtendo resultados satisfatórios na produção destes genes em *E. coli*.

Uma variedade de antígenos vacinais já foram introduzidos e expressos em *E. coli*, apresentando uma variabilidade de resultados quanto a sua eficácia na proteção contra o desafio. Vantagens das vacinas recombinantes de subunidade são inúmeras. Primeiro, o patógeno pode ser inteiramente excluído da produção da vacina, o que elimina os riscos associados à contaminação por compostos tóxicos, e da reversão para virulência. Além da possibilidade de otimização das formas de apresentação destes antígenos, adaptando a resposta imune às especificidades do patógeno contra o qual a vacina é destinada (LILJEQVIST; STÅHL, 1999).

Vários estudos têm avaliado proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*, nas mais diversas formas de administração e formulações, buscando o desenvolvimento de vacinais mais eficientes para o controle da PES (CHEN et al., 2001, 2006a, 2006b, 2008; FAGAN et al., 2001; LIN et al., 2003; SHIMOJI et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2006; OKAMBA et al., 2007). Algumas delas avaliadas individualmente, outras associadas a vetores bacterianos atenuados, fusionadas a adjuvantes de mucosa, e também avaliadas como um coquetel de antígenos. Sendo que algumas destas proteínas recombinantes foram utilizadas em experimento de desafios em suínos, porém a grande maioria delas avaliadas apenas em camundongos. Diferenças na imunidade induzida por estes antígenos foram observadas, as quais podem ser influenciadas pelas diferenças nas construções vacinais, 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). No entanto estas avaliações sugerem que estas novas

- 1 abordagens vacinais podem representar novas estratégias promissoras, e
- 2 economicamente viáveis para o controle da PES.

3

2. OBJETIVOS

Identificação e caracterização de seqüências codificadoras de proteínas transmembrana de *M. hyopneumoniae*, visando o desenvolvimento de uma vacina contra PES.

2.1 Objetivos Específicos

- Selecionar, clonar, expressar e purificar proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando *E. coli* como sistema heterólogo de expressão;
- Avaliar a imunogenicidade das proteínas recombinantes em camundongos;
- Avaliar a antigenicidade destas proteínas com soro de suínos naturalmente infectados com *M. hyopneumoniae*.

1 **3. ARTIGO**

2

3

4 **Produção heteróloga e caracterização de proteínas transmembrana de**
5 ***Mycoplasma hyopneumoniae***

6

7

Produção heteróloga e caracterização de proteínas transmembrana de
Mycoplasma hyopneumoniae

S.B. Marchioro, S. Simionatto, V. Galli, F.R. Conceição, O.A. Dellagostin *

Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de
Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

* Autor para correspondência:

Odir Antônio Dellagostin

Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel.

Campus universitário s/nº; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas-RS; Brasil.

odir@ufpel.edu.br

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, uma doença respiratória crônica que causa grandes perdas econômicas na indústria suína em todo mundo. A proteção induzida com as atuais vacinas contra a doença é frequentemente incompleta, não prevenindo o estabelecimento da enfermidade. Neste trabalho, foram avaliadas proteínas transmembrana de *M. hyopneumoniae*, para sua possível utilização em novas formulações de vacinas e também em testes diagnósticos. Utilizando a abordagem denominada vacinologia reversa, foi possível selecionar e clonar 17 seqüências codificadoras, das quais 7 foram expressas em *E. coli* e avaliadas quanto a sua capacidade imunogênica e antigênica. A resposta imune humoral induzida por estas proteínas foi avaliada através da inoculação de camundongos BALB/c. Os resultados obtidos demonstraram que todas foram capazes de induzir uma resposta imune específica. Na análise antigênica utilizando soros de suínos naturalmente infectados, algumas apresentaram reação mais intensa, mas todas reagiram com anticorpos presentes nestes soros, indicando sua presença durante a infecção. Os antígenos avaliados não foram reconhecidos por anticorpos nos soros de camundongos imunizados com a vacina comercial. O presente estudo revela que estes antígenos podem contribuir em novas e mais eficientes estratégias de vacinação contra a PES, assim como em testes diagnósticos.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, proteínas transmembrana, vacina, PES.

1 INTRODUÇÃO

2 *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica
3 suína (PES), uma doença respiratória crônica, que causa importantes perdas na
4 indústria suinícola em todo mundo e aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a
5 infecções secundárias (DeBey & Ross, 1994), afetando principalmente suínos na
6 fase de crescimento e terminação (Thacker, 2006). Essas perdas estão
7 principalmente relacionadas aos decréscimos no ganho de peso médio diário,
8 aumentos nas taxas de conversão alimentar e aumento nos custos com medicação
9 (Ross, 1999).

10 O controle da infecção de *M. hyopneumoniae* pode ser realizado de diferentes
11 maneiras dentre as quais se destacam: boas práticas de manejo e condições de
12 alojamento, uso de antimicrobianos e vacinação dos animais (Maes et al., 2008). No
13 entanto, a vacinação parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES (Lin et al.,
14 2003). Apesar da importância da vacinação como a principal estratégia de controle,
15 as vacinas disponíveis comercialmente conferem somente uma proteção parcial
16 (Thacker et al., 2000), não prevenindo a colonização do trato respiratório pela
17 bactéria, um pré-requisito para o desenvolvimento da doença, mas reduzindo o
18 número de organismos (Meyns et al., 2006) e diminuindo a infecção no rebanho
19 (Sibila et al., 2007). Estas vacinas são constituídas de preparados de células inteiras
20 inativadas (bacterinas), o que encarece seu custo de produção (Chen et al., 2001),
21 pois seu crescimento *in vitro* requer um meio rico, consumindo muito tempo e gastos
22 na sua produção (Ross, 1999). Esta complexidade do meio requerido para o cultivo
23 de *M. hyopneumoniae* e a falta de informações dos antígenos expressos em
24 diferentes formulações de meio, requerem estratégias alternativas de formulações
25 de vacinas, justificando assim novas investigações (Chen et al., 2008).

26 Esforços no desenvolvimento de vacinas efetivas e seguras contra
27 micoplasmas têm sido parcialmente bem sucedidas (Chen et al., 2003). A produção
28 de vacinas recombinantes experimentais contra a PES vem se destacando no
29 cenário científico, uma vez que o cultivo de *M. hyopneumoniae* não é necessário.
30 Algumas destas vacinas experimentais apresentaram resultados promissores (Fagan
31 et al., 1996; Chen et al., 2003; Shimoji et al., 2003), entretanto também conferiram
32 proteção parcial aos suínos, que pode ser atribuída pela constituição de um único

antígeno, sugerindo que uma vacina multivalente possa conferir uma proteção mais completa (Chen et al., 2008).

Várias pesquisas têm surgido para identificar e caracterizar antígenos de *M. hyopneumoniae* (Yang et al., 2005; Castro et al., 2006; Chen et al., 2006; Conceição et al., 2006). Um exemplo é o projeto brasileiro PIGS – Rede Sul de Análises de Genoma e Biologia Estrutural – Programa de Investigações de Genomas Sul, que concretizou o seqüenciamento do genoma deste microrganismo. As publicações da seqüência de três genomas de *M. hyopneumoniae*, duas cepas patogênicas (232 e 7448) e uma não patogênica (J) (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005) vêm contribuindo com as pesquisas, e acelerando o processo de identificação de novas proteínas antigênicas. Estes antígenos encontrados poderão ser úteis no imunodiagnóstico e/ou vacinação contra a PES (Pinto et al., 2007).

Neste trabalho foram identificadas e caracterizadas seqüências codificadoras de proteínas transmembrana de *M. hyopneumoniae*, visando o desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante contra a PES. Este estudo permitiu a identificação e caracterização de novos alvos potencialmente antigênicos, sendo, portanto, um passo importante na definição de estratégias alternativas para a produção de insumos eficientes para o controle da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cepas, cultivo e extração de DNA

As cepas de *M. hyopneumoniae* 7448, 7422 (patogênicas) e J (não patogênica), e de *M. hyorhinis* foram cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPSA – Embrapa, Concórdia, SC). O DNA genômico foi extraído utilizando o kit *GFX genomic blood DNA purification* (GE Healthcare). As cepas de *Escherichia coli* utilizadas foram TOP 10 (Invitrogen, USA), como cepa de clonagem, e *E. coli* BL21(DE₃) RIL como cepa de expressão, as quais foram multiplicadas a 37 °C em meio Luria Bertani (LB) suplementado com 100 µg/ml de canamicina, quando necessário.

2. Seleção das seqüências codificadoras (CDS) e desenho dos primers

As CDS pertencentes ao grupo de proteínas transmembrana da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*, previamente caracterizadas (<http://www.genesul.lncc.br>), foram

1 analisadas com o programa Vector NTI 10 (Invitrogen) buscando seqüências
2 hidrofílicas e com no máximo três códons de triptofano (TGA). Para os alvos
3 selecionados foram projetados *primers* a partir da seqüência da cepa 7448
4 depositada no GenBank, número de acesso NC_007332. Os *primers* utilizados na
5 amplificação foram projetados com sítios para enzimas de restrição e, no *primer*
6 *forward*, a seqüência CACC para a clonagem direcional no vetor de expressão
7 Champion pET 200D/TOPO His-Tag (Invitrogen) (Tabela 1).

9 3. Amplificação e clonagem das seqüências codificadoras

10 As seqüências selecionadas foram amplificadas por PCR. A reação foi
11 realizada em um volume final de 25 µl, contendo aproximadamente 50 ng de DNA
12 genômico, 10 pmol de cada *primer*, *enhancer* 1x, tampão de enzima 1x, 2,5 mM
13 MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades da enzima Platinum *Pfx* DNA Polymerase
14 (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador Mastercycle Gradient
15 (Eppendorf), no qual as amostras foram submetidas às seguintes etapas:
16 desnaturação inicial (95 °C, 7 min) seguida de 30 ciclos de desnaturação (95 °C, 1
17 min), anelamento (55 °C, 1 min) e extensão (68 °C, 1 min), sendo que ao término
18 destes 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (68 °C, 7 min).
19 As seqüências que continham códons TGA foram submetidas à mutagênese sítio-
20 dirigida, com o auxílio da técnica de PCR – *overlapping* (Ho et al., 1989), conforme
21 descrito por Simionatto et al. (2006). Os fragmentos gerados nas amplificações
22 foram submetidos à ligação no vetor de expressão Champion pET200D/TOPO His-
23 tag seguindo as especificações do fabricante (Invitrogen). O produto da ligação foi
24 transformado em células competentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen), preparadas
25 para eletroporação conforme descrito por Sambrook & Russell (2001). As colônias
26 resultantes da transformação foram submetidas a uma triagem rápida pelo método
27 de microprep (Jouglard et al., 2002), para seleção dos possíveis recombinantes. Os
28 clones recombinantes tiveram seu DNA plasmidial extraído seguindo o protocolo de
29 lise alcalina (Sambrook & Russell, 2001) e caracterizado com enzimas de restrição.

1 **Tabela 1.** Identificação das CDS selecionadas e sequência dos *primers*.

Nº	Gi (Código Genbank)	Provável Função	Sequência dos <i>Primers</i>
1	gi 72080361	Transportadora ABC	<i>For*</i> <u>CACCGGATCCGGCAAATTCAAACTGGAC</u> <i>Rev</i> GGAAGCTTTCACAAAACCCCAATCATTTTC
2	gi 72080362	Transportadora ABC	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATTTTTAAAAAATTAATCTTGTA</u> <i>Rev</i> GGAAGCTTTCATATTGAAATTGAATCTAATT
3	gi 72080363	Transportadora ABC	<i>For</i> <u>CACCGGATCCTCACTACAGATTTCTGCAAAA</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAACATAAATTTCTTGCAAAAAA <i>**For mut</i> ATTTCTTGgATTGGTAAAAATT <i>**Rev mut</i> ACCAATcCAAGAAATCGACT
4	gi 72080580	Translocase	<i>For</i> <u>CACCGGATCCTTTCTTGCTTTTTTGACTT</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCACTCAAGTTGAGCTTTTTTATC
5	gi 72080587	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCCTAGGACAGTTTGCAATAATTATTGT</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAATTTATCTTTTTATCATCAATAATTTG <i>For mut</i> GGATTTTGgGAATGgTTTTGgGGCAAATTA <i>Rev mut</i> TTTGCCcCAAAAcCATTcCAAAATCCTTG
6	gi 72080604	Transportadora ABC	<i>For</i> <u>CACCGGATCCTATTTAGTAAACCGACTGTTT</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCACTTTGGCAAATGCGAAA
7	gi 72080665	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATGACCAAATTTGCAAAA</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCACTAGTAACATGTTCTTTCCA
8	gi 72080669	Serina Protease	<i>For</i> <u>CACCGGATCCTATGCTTCAAATTTTAGT</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCACTTATTAGTAGATC
9	gi 72080680	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATGAAAATAAAAAACAAA</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAAGGGAATGGAGTACC
10	gi 72080719	Transportadora ABC	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATGATTCAAATTCGTAATGTT</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAATTTTTTTGCTAATATCAGC
11	gij72080747N	Provável ICEF-II***	<i>For</i> <u>CACCGGATCCTTCAATAGAAAAGAATATTACTATTC</u> <i>Rev</i> GGAAGCTTTTCATTTATTAACATAAATTATGAAA
12	gij72080747C	Provável ICEF-II	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATAAACAACCCAAATATTTATTC</u> <i>Rev</i> GGAAGCTTTTAACTATTATACCTTTTAATTTTCC
13	gi 72080775	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGGTACCGATTGATTTTGCTTTTTTG</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAAGATTCTACCATTAATCTTT
14	gi 72080811	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATGACTGGATCAAAAACATA</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCACTGCTTTATTATTATCGATC
15	gi 72080818	Provável transportadora Mg ²	<i>For</i> <u>CACCGGATCCGATAAAAAAAGTTCTTTTCTTTT</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAAAAAACTCTTGATTTTACGAT
16	gi 72080820	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCCAGCAAACCTTATAATTCTC</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAAGGAATAATCAAGAACGA
17	gi 72080875	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCATTAAATCAGTTGATTAATTTCTTTT</u> <i>Rev</i> GGAAGCTTTTCAGCATGAATTTATTTTTTATTA
18	gi 72080924	Proteína hipotética	<i>For</i> <u>CACCGGATCCCTTAGCCAAAATCCACTAC</u> <i>Rev</i> CCCAAGCTTTCAATTTTCGTTTTTATC
19	gi 72080970	Hemolisina C	<i>For</i> <u>CACCGGATCCTTTTTATCGGTTTTTTTTAT</u> <i>Rev</i> GGAAGCTTTTCAGTTAATCGTTACAATAATTG <i>For mut</i> CCAGTCTGgAAAGAGAATAATT <i>Rev mut</i> ATTCTCTTTcCAGACTGGAAT

2 *CACC: Sequência de nucleotídeos adicionada para clonagem direcional no vetor Champion pET
3 200D/TOPO His-Tag (Invitrogen).

4 ** Pares de *primers* utilizados para a mutação do códon TGA para TGG.

5 *** ICEF- II: *integrative conjugal element* - II

6

7 **4. Expressão, teste de solubilidade e purificação das proteínas recombinantes**

8 Plasmídios recombinantes foram transformados em cepa de expressão *E. coli*
9 BL21 (DE₃) Ril, através do protocolo de transformação por choque térmico, segundo
10 Sambrook & Russell (2001). As colônias resultantes foram cultivadas em 10 ml de
11 LB caldo suplementado com 100 µg/ml de canamicina, a 37 °C sob agitação

1 constante, até a fase *log* de crescimento, e a expressão induzida com 0,5 mM de
2 isopropil β -D-tiogalactosídeo (IPTG), durante 3 h. Duas frações de 500 μ l, uma
3 coletada antes da indução e outra após, foram centrifugadas a 14.000 x g por 1 min.
4 O sedimento formado foi utilizado para verificar a expressão em pequena escala das
5 proteínas recombinantes, através de SDS-PAGE 15%, com extrato protéico total de
6 cada clone, além do extrato da cepa utilizada na expressão. O teste de solubilidade
7 das proteínas foi realizado utilizando-se 2 ml da amostra induzida e submetendo-a a
8 uma centrifugação de 14.000 x g por 5 minutos. Ao *pellet* adicionou-se 500 μ l de
9 tampão fosfato salino 1x (PBS) e as células foram lisadas por seis ciclos de
10 sonicação (15 s, 20 kHz). As frações solúveis e insolúveis foram separadas por
11 centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Ambas as frações foram processadas e
12 submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para identificação e
13 localização das proteínas. Um clone recombinante de cada plasmídeo foi usado para
14 inocular 15 ml de LB contendo 100 μ g/ml de canamicina e cultivado *overnight* em
15 *shaker* (37 °C, 250 rpm). Esse cultivo foi utilizado para inocular 500 ml de LB líquido
16 suplementado com canamicina, nas mesmas condições anteriormente descritas.
17 Após as 3 horas de indução, o cultivo foi submetido à centrifugação a 6.000 x g por
18 20 min a 4°C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* submetido a duas sucessivas
19 lavagens, em 60 ml de PBS e centrifugado nas mesmas condições, para então ser
20 ressuspenso em 60 ml da solução desnaturante (8 M uréia, 20 mM Na₂HPO₄, 0,5
21 M NaCl, 5 mM Imidazole). As células foram então lisadas por seis ciclos de
22 sonicação (15 s, 20 kHz) e submetidas à agitação orbital de 60 rpm por 16 h a 4 °C.
23 Após esse tempo, essas células foram novamente centrifugadas a 10.000 x g
24 durante 1 h a 4 °C, o sobrenadante contendo a proteína, coletado, filtrado em filtro
25 0,8 μ m (*Millipore*) e utilizado para purificação. A purificação das proteínas
26 recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando o sistema de
27 cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (GE Healthcare), em coluna de
28 sepharose (His Trap™) carregada com níquel. A pureza das proteínas foi avaliada
29 através por SDS-PAGE 15% e a quantificação pelo kit BCA™ Protein Assay (Pierce)
30 seguindo as instruções do fabricante.

32 5. Inoculação em camundongos

33 Camundongos BALB/c, machos e fêmeas, cinco animais em cada grupo, com
34 aproximadamente sete semanas de idade, foram inoculados com as proteínas

1 recombinantes purificadas. Duas doses intramusculares (IM) de 50 µg de proteína
2 foram administradas em um intervalo de 21 dias. Utilizou-se 15% de hidróxido de
3 alumínio como adjuvante. Além das proteínas, inoculou-se um grupo com solução
4 salina 0,85% acrescida do adjuvante, atuando como controle negativo e um grupo
5 com uma bactéria comercial. O sangue dos animais foi coletado um dia antes da
6 primeira imunização e nos dias 21, 42, 63, 84 e 105 do plexo venoso retrocular. Os
7 soros foram separados por centrifugação e congelados a -20 °C.

9 **6. Avaliação da resposta imune por ELISA**

10 A resposta imune foi monitorada por ELISA indireto, com o soro individual de
11 cada animal inoculado com as proteínas recombinantes. Os soros de todos os
12 animais do grupo foram confrontados com a proteína neles inoculadas, a qual servia
13 como antígeno da reação. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com as
14 proteínas recombinantes em uma concentração de 100 ng por poço, diluídas em
15 tampão carbonato bicarbonato pH 9,6, e incubadas *overnight* a 4°C. Após
16 incubação, foram lavadas com PBS-T (PBS acrescido de 0,05% Tween 20) e
17 bloqueadas com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado diluído em PBS)
18 por 2 h a 37 °C. Os soros dos camundongos foram diluídos 1:50, em solução de
19 bloqueio, adicionados na placa após nova lavagem, e mantidos por 2 h a 37 °C. As
20 placas foram lavadas, e adicionou-se o soro anti-imunoglobulina de camundongo
21 conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) em uma diluição de 1:4.000, incubando-
22 se novamente a 37 °C por 1 h. As reações foram reveladas com o substrato o-
23 Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) acrescido de peróxido de hidrogênio, por
24 15 min, após lavagens. A reação foi parada com 50 µl da solução de ácido sulfúrico
25 1 N. A leitura da densidade óptica foi feita em filtro de 492 nm em leitor de ELISA
26 (Dynatech Labs. Inc., Chantilly, VA, USA).

28 **7. ELISA com extrato de célula**

29 Para avaliar a capacidade dos anticorpos induzidos nos soros de
30 camundongos inoculados com as proteínas recombinantes, quanto ao
31 reconhecimento de proteínas nativas de *M. hyopneumoniae*, foi realizado um ELISA
32 com extrato de célula. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µl/poço
33 de lisado de célula de *M. hyopneumoniae* cepa 7448, na diluição 1:800, dissolvido
34 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6, incubadas *overnight* a 4 °C. Depois

1 incubadas a -70 °C por 2 h e descongeladas a temperatura ambiente, as placas
2 foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com 200 µl de solução de bloqueio 5%
3 *overnight* a 4 °C. Pool de soros de cada grupo dos camundongos, das coletas do dia
4 anterior a primeira imunização e do dia 84, foram diluídos 1:20 em solução de
5 bloqueio, adicionados na placa após nova lavagem, e mantidos por 3 h a 37 °C. As
6 placas foram lavadas, e adicionou-se o soro anti-imunoglobulina de camundongo
7 conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) em uma diluição de 1:4.000, incubando-
8 se novamente a 37 °C por 1 h. As reações foram reveladas conforme descrito no
9 item 6.

11 **8. Reconhecimento dos antígenos recombinantes em soros de suínos SPF,** 12 **imunizados e naturalmente infectados**

13 Utilizando amostras de soro de suínos SPF, imunizados (fornecidos pelo
14 CNPSA – Embrapa, Concórdia, SC) e de animais naturalmente infectados
15 (provenientes de um rebanho comercial com sinais clínicos e lesões patológicas
16 compatíveis com PES), foi avaliada a capacidade de reação destes antígenos
17 recombinantes com os anticorpos produzidos durante a infecção. Os soros foram
18 testados pela técnica de *Western blot* e por ELISA.

19 **8.1. Western blot**

20 As proteínas recombinantes, após eletroforese em gel de poliacrilamida 12%,
21 sob condições redutoras de acordo com Laemmli (1970), foram transferidas para
22 uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), seguindo as instruções do
23 fabricante (Mini transblotter, Bio-Rad). As membranas foram incubadas em solução
24 de bloqueio 5%, *overnight* a 4 °C. Os soros de suínos utilizados foram diluídos 1:100
25 em solução de bloqueio, e previamente adsorvidos com o extrato da cepa na qual as
26 proteínas foram expressas (*E. coli* BL21(DE₃) Ril). Após lavagem, a membrana foi
27 incubada com os soros por 2 h a 37 °C. O anticorpo anti-IgG suíno conjugado com
28 peroxidase (Sigma) foi utilizado na diluição 1:6000 em solução de bloqueio, após
29 nova lavagem da membrana, por 1 h a 37 °C. As reações foram reveladas com DAB
30 e 0,5 % de peróxido de hidrogênio diluídos em PBS.

31 **8.2. ELISA**

32 No ELISA a concentração das proteínas recombinantes utilizadas para
33 sensibilizar as placas variaram entre 5 e 50 ng por poço, de acordo com os
34 resultados obtidos na padronização. Foram diluídas em tampão carbonato

bicarbonato pH 9,6, e incubadas a 4 °C *overnight*. As placas foram lavadas e incubadas com 200 µl de solução de bloqueio 5% por 2 h a 37 °C. Sendo novamente lavadas e adicionado os soros suínos, diluídos 1:100 em solução de bloqueio, por 2 h a 37 °C. O anticorpo anti-IgG suíno conjugado com peroxidase (Sigma) 1:6000, foi adicionado após nova lavagem e incubado a 37 °C por 1h. As reações foram reveladas com OPD (Sigma) e peróxido de hidrogênio, parada com ácido sulfúrico 1 N, e lida em leitor de ELISA com filtro de 492 nm. Foram avaliados 22 soros de suínos naturalmente infectados, 3 soros de suínos imunizados com a cepa 7448, e 5 soros de suínos SPF, os quais serviram como controle negativo, e um soro como controle positivo da reação. Todos testados em triplicatas.

9. Análise estatística

Os resultados do ensaio de sorologia dos camundongos vacinados e dos suínos SPF e naturalmente infectados foram comparados utilizando teste T. Todas as análises estatísticas foram realizadas no nível de 5% de significância através do programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1. Seleção das CDS

Com o auxílio dos programas de bioinformática foram selecionados e desenhados *primers* para 18 regiões codificadoras (CDS) pertencentes ao grupo de proteínas transmembrana da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*. De uma das regiões codificadoras foi selecionado duas regiões, C e N-terminal. No total foram selecionados 19 fragmentos.

2. Amplificação, clonagem e caracterização dos genes

Todos os fragmentos selecionados foram amplificados pela técnica de PCR, sendo que destes três possuíam TGA e foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida. Uma alíquota do produto de PCR das seqüências amplificadas foi submetida à ligação no vetor Champion pET200D/TOPO His-Tag (Invitrogen) e à transformação em células de *E. coli* Top 10 (Invitrogen) eletrocompetentes. Após triagem rápida, diversos clones foram caracterizados como recombinantes, sendo alguns deles selecionados e o seu DNA plasmidial extraído e submetido à

caracterização enzimática, confirmando a presença e a orientação do inserto. Dos 19 fragmentos amplificados, 17 deles foram clonados e caracterizados (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos alvos, região amplificada, tamanho e resultados obtidos

Gi (Código Genbank)	Região Amplificada (aa)	Tamanho (pb)	Tamanho Proteína (kDa)	Clonada
Gi 72080875	31- 386	1086	41	Sim
Gi 72080747N	67-284	672	26	Sim
Gi 72080747C	904 -1199	906	31	Sim
Gi 72080970	131 - 345	666	26	Sim
Gi 72080361	238 - 665	1305	50	Sim
Gi 72080362	16 - 298	867	35	Sim
Gi 72080363 *	278 - 671	1204	42	Sim
Gi 72080580	20 - 195	550	22	Sim
Gi 72080587 *	248 - 748	1525	60	Sim
Gi 72080604	123 - 311	589	23	Sim
Gi 72080665	1 - 172	516	21	Sim
Gi 72080719	1 - 257	768	29	Sim
Gi 72080669	56 - 264	624	25	Sim
Gi 72080680	1 - 166	495	19	Sim
Gi 72080775	31 - 512	1443	56	Não
Gi 72080811	258 - 524	798	31	Sim
Gi 72080818	2 - 284	846	32	Não
Gi 72080820	576 - 744	504	20	Sim
Gi 72080924	110 - 379	807	31	Sim

*: Indicam as CDS que foram submetidas à mutagênese sítio-dirigida.

3. Expressão e purificação

Os clones caracterizados por restrição enzimática e que apresentaram o inserto do tamanho esperado foram submetidos à transformação por choque térmico na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE₃) Ril. Antes de serem expressas em grandes quantidades, as proteínas foram avaliadas em menor volume quanto a sua solubilidade e expressão. Todas as proteínas expressas demonstraram-se insolúveis, sendo então solubilizadas com agente desnaturante. Como o vetor de expressão utilizado (pET200D/TOPO His-tag) permite a fusão de 6 resíduos de

histidina na porção N-terminal das proteínas recombinantes, as mesmas foram purificadas por cromatografia de afinidade. Dos 17 clones, oito proteínas recombinantes foram expressas e purificadas com sucesso, em concentrações variadas, mas suficientes para as imunizações e demais testes realizados (Fig. 1). Das oito proteínas purificadas apenas a 747N não foi utilizada para inoculação em animais, devido ao seu baixo grau de pureza.

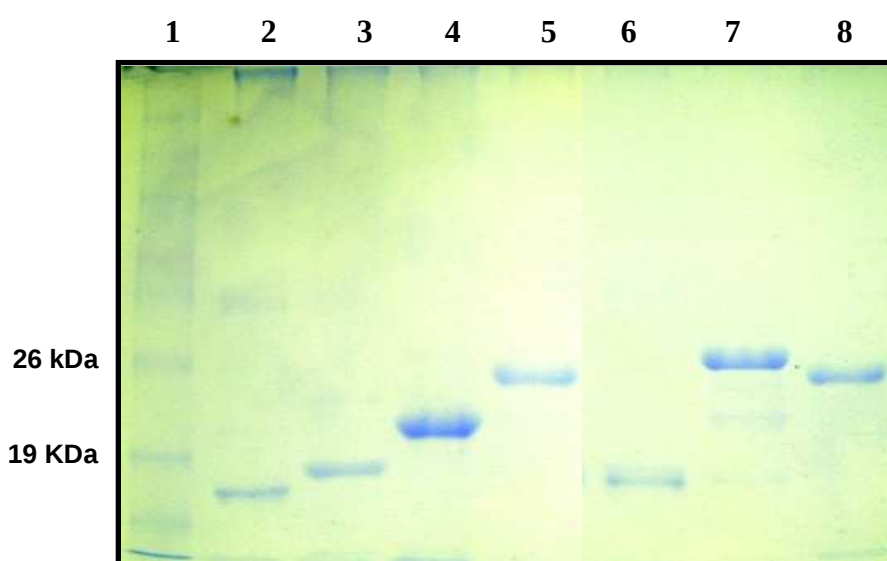


Fig. 1. Gel de poliácridamida 12% corado com *Comassie Blue* mostrando as sete proteínas recombinantes purificadas. Coluna 1, Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder; coluna 2, 363 (42 kDa); coluna 3, 665 (21 kDa); coluna 4, 669 (25 kDa); coluna 5, 811 (31 kDa); coluna 6, 820 (20 kDa); coluna 7, 924 (31 kDa); coluna 8, 747C (31 kDa).

4. Resposta imune humoral

A capacidade das proteínas recombinantes estimularem anticorpos específicos foi determinada após a imunização de camundongos, através de um ELISA indireto. Os grupos de animais inoculados foram assim identificados: grupo A: controle negativo (solução salina + adjuvante), B: proteína 363, C: 669, D: 747C, E: 811, F: 820, G: 924, H: 656 e o grupo I: animais inoculados com a bactéria. O perfil imunogênico avaliado das sete proteínas inoculadas demonstrou que todas foram capazes de induzir uma resposta imune específica, apresentando significância estatística quando comparadas com o grupo controle. Os testes de ELISA realizados com os soros dos animais imunizados com estes antígenos apresentaram uma

resposta imune elevada já a partir do 21º dia após a inoculação. Esta resposta aumentou ainda mais após a 2ª dose, apresentando um aumento progressivo até o 42º dia, e após mantendo-se constante. A proteína que induziu uma maior resposta foi a 665, enquanto que a proteína 924 induziu a menor resposta imune, dentre todas testadas. A Fig. 2 demonstra as respostas de todas as proteínas até o 84º dia após a inoculação.

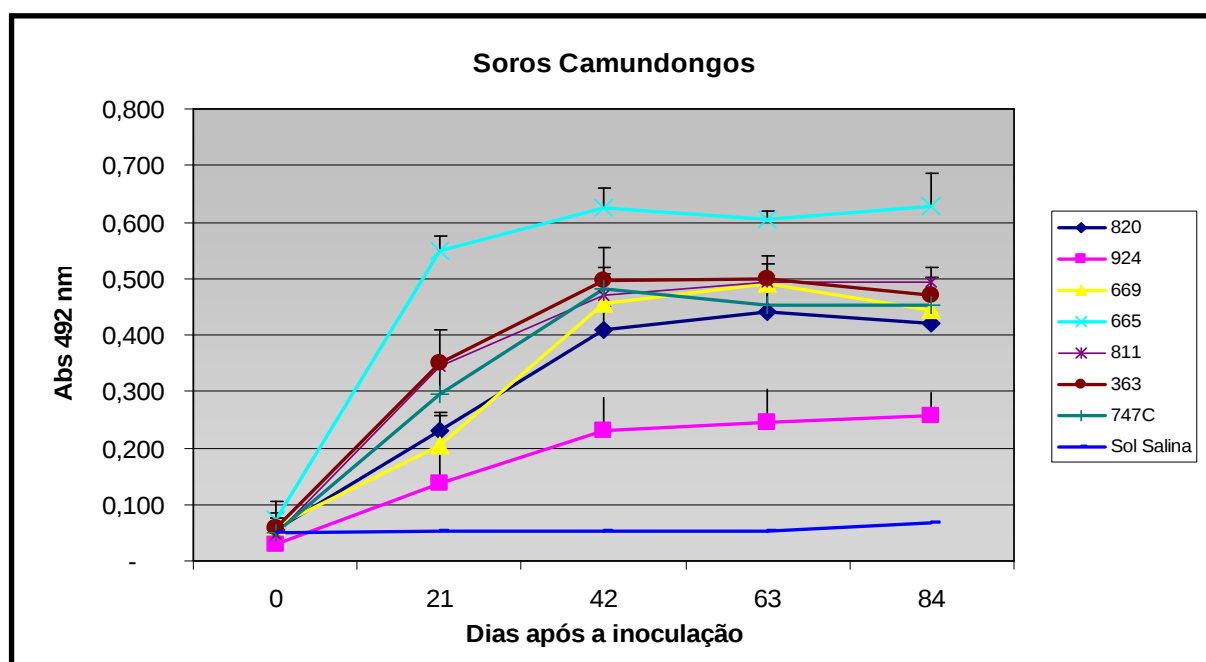


Fig. 2. Resposta imune humoral dos animais inoculados com as proteínas recombinantes e do grupo controle negativo (salina/ $\text{Al}(\text{OH})_3$). Mensurada através de ELISA e expressa em absorbância, representando a média e o desvio padrão das coletas de cada grupo.

5. ELISA com extrato de célula

Todos os soros dos grupos de animais inoculados foram avaliados contra o extrato de células totais de *M. hyopneumoniae* cepa 7448. Foram comparadas as respostas do *pool* de soros de cada grupo, da coleta anterior à imunização (pré-imune) com o dia 84 (imune). As proteínas 811 e 665 apresentaram diferença estatística significativa nos valores de absorbâncias dos soros pré-imune para o imune (Fig. 3).

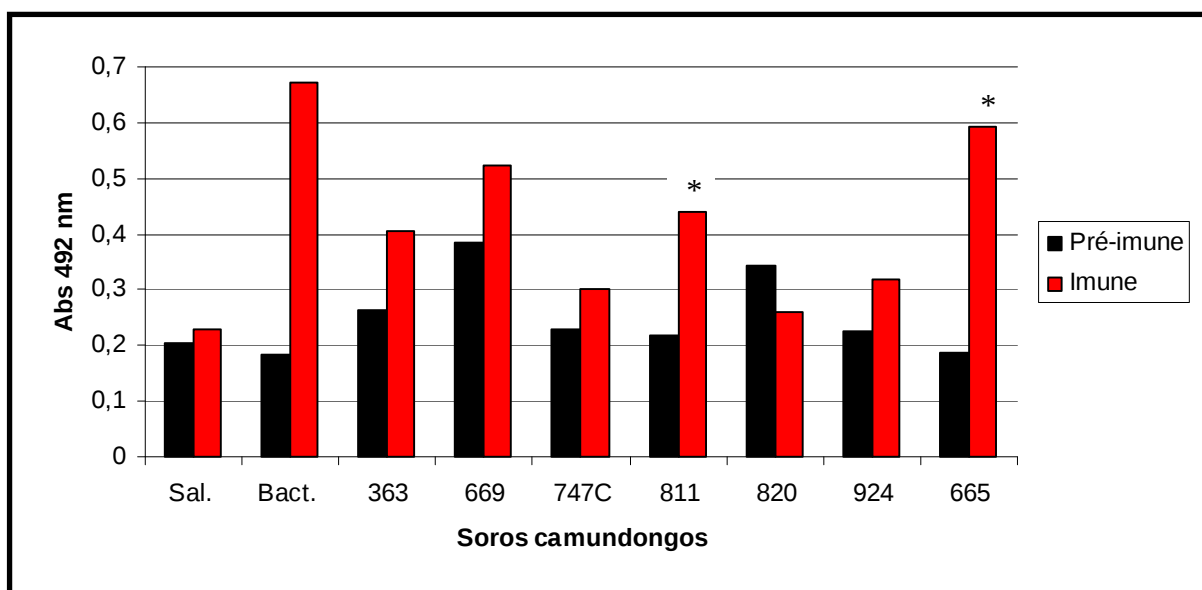


Fig. 3. Resposta de IgG anti *M. hyopneumoniae* nos soros de camundongos inoculados com as proteínas recombinantes utilizando ELISA com extrato de células. Foi avaliado *pool* de soro dos dias 0 (pré-imune) e 84 (imune), de cada grupo de animal inoculado com as proteínas recombinantes, com a bacterina e com o grupo controle negativo (sal.). * $p < 0,05$ em comparação ao soro pré-imune.

6. Reconhecimento dos antígenos recombinantes por soros de suínos SPF, imunizados e naturalmente infectados

Pela técnica de *Western blot*, as proteínas foram confrontadas com 10 diferentes soros de suínos provenientes de um rebanho comercial, necropsiados e com lesões sugestivas de pneumonia enzoótica suína, três soros de animais imunizados com a cepa 7448, avaliados em *pool*, e um soro de animal SPF. Quatro proteínas foram reconhecidas pelo soro de alguns dos animais naturalmente infectados. Todos os soros foram capazes de reconhecer o extrato protéico de *M. hyopneumoniae*. A proteína 747N foi a única reconhecida no soro dos animais hiperimunes. As identificações dos soros e das proteínas, bem como sua reatividade encontram-se listados na tab. 3.

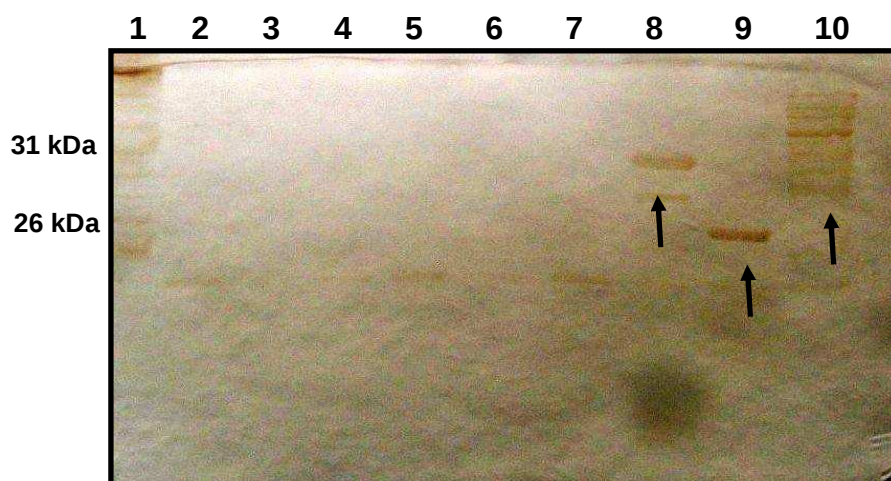
1 **Tabela 3.** Reatividade das proteínas recombinantes frente aos soros suínos.

Proteína (Gi)	Provável Função	Soro 2	Soro 12	Soro 23	Soro 24	Soro 27	Soro 33	Soro 38	Soro 41	Soro 45	Soro 46	Soro SPF	Pool Imun*
72080363	Transportadora ABC												
72080669	Serina Protease					+							
72080747C	ICEF-II												
72080811	Proteína Hipotética												
72080820	Proteína Hipotética												
72080924	Proteína Hipotética	+	+			+	+	+	+	+			
72080665	Proteína Hipotética								+				
72080747N	ICEF-II			+	+	+	+	+	+	+			+
Extrato MH		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2 *:Pool de soro dos animais hiperimunes (695, 704 e 731).

3 **: Sinal + indica reação positiva.

4
5 Dentre as proteínas testadas, duas delas, 747N e 924, destacaram-se pela
6 sua capacidade antigênica, sendo reconhecidas por um maior número de soros.
7 Ambas reagiram com sete dos dez soros testados (Fig. 4).



8
9
10
11 **Figura 4.** Western blot demonstrando a reatividade das proteínas recombinantes
12 com o soro 41. Coluna 1: Extrato *M. hyopneumoniae*; coluna 2: 363 (42 kDa); coluna
13 3, 669 (25 kDa); coluna 4, 747C (31 kDa); coluna 5, 811 (31 kDa); coluna 6, 820 (20
14 kDa); coluna 7, 820 (20 kDa); coluna 8, 924 (31 kDa); coluna 9: 665 (21 kDa); coluna
15 10: 747N (26 kDa). As setas indicam a reação das proteínas: 924, 665 e 747N,
16
17 respectivamente.

Mediante ELISA, todas as proteínas confrontadas com 22 soros de suínos naturalmente infectados apresentaram uma reação estatisticamente significativa quando comparadas com soros de animais SPF, demonstrando a capacidade destes antígenos em reagir com anticorpos produzidos durante infecção natural por *M. hyopneumoniae*. As médias dos soros, avaliados em triplicatas, dos animais naturalmente infectados e SPF, bem como a sua dispersão estão demonstradas na Fig. 5.

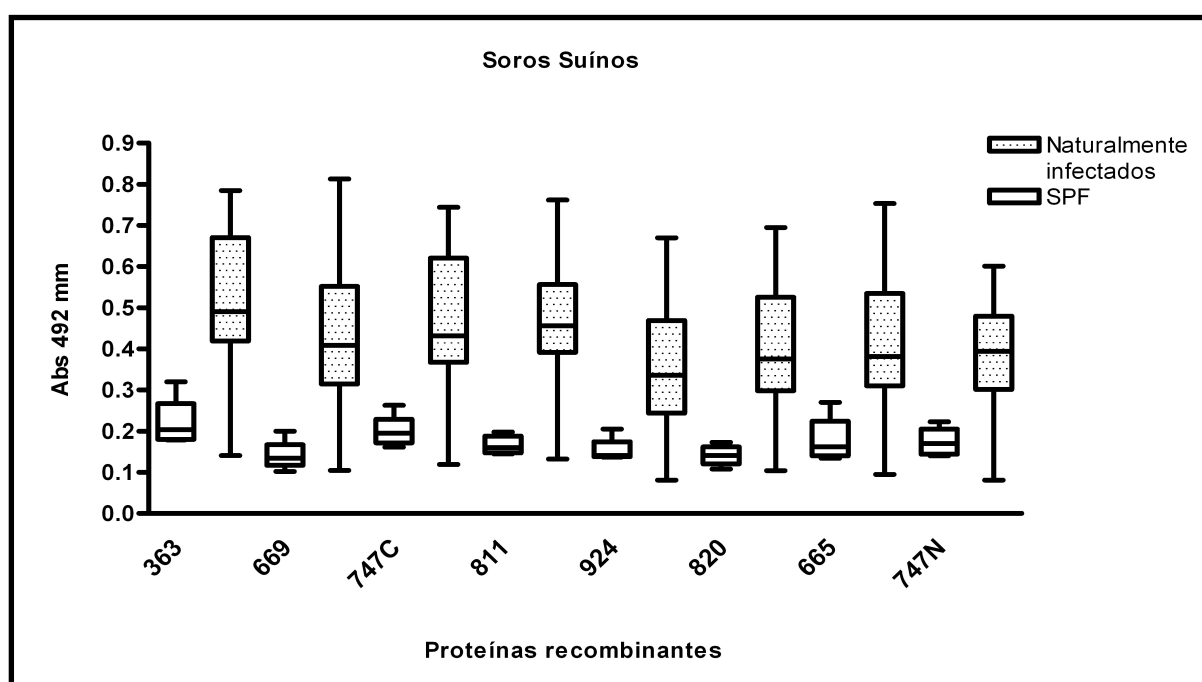


Fig. 5. Avaliação antigênica pela técnica de ELISA das proteínas recombinantes contra soro suíno naturalmente infectado. Média dos soros dos animais SPF (branco) e naturalmente infectados (pontilhada) é traçada no interior das caixas.

DISCUSSÃO

Vacinação tem sido uma importante ferramenta preventiva no controle da infecção por *M. hyopneumoniae* e para as consequências nocivas da doença, porém, a eficácia da imunização varia de rebanho para rebanho, de fatores ambientais e de práticas de manejo (Reynolds et al., 2008). No entanto, as vacinas disponíveis comercialmente conferem apenas uma proteção parcial aos suínos (Haesebrouck et al., 2004). A necessidade de vacinas com maior potencial protetor, de fácil obtenção tem estimulado as pesquisas na busca por antígenos protetores. O seqüenciamento de três cepas de *M. hyopneumoniae* (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005) permite utilizar a abordagem genômica na produção de vacinas denominada vacinologia reversa (Rappuoli, 2000), as quais poderão contribuir no desenvolvimento de novas e mais eficientes formulações de vacinas contra a PES.

Neste estudo, antígenos de *M. hyopneumoniae* pertencentes ao grupo de proteínas transmembrana foram avaliados como candidatos a vacina e para utilização no sorodiagnóstico da PES. Estes antígenos foram primeiramente avaliados quanto a sua possível relação com a antigenicidade e a patogenicidade através de programas de bioinformática, e também quanto ao número de códons triptofano neles existentes, pois micoplasmas não utilizam o código genético padrão. O aminoácido triptofano nestas espécies é codificado pelo códon TGA (Razin et al., 1998), o qual é um códon de terminação na maioria dos organismos. A substituição na seqüência do DNA do códon TGA para o códon TGG é necessária para a expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos. A mutagênese sítio-dirigida através de PCR com extensão de região sobreposta, descrita por Ho et al. (1989) e adaptada por Simionatto et al. (2006), foi a metodologia utilizada com sucesso para realizar a substituição neste estudo.

A metodologia de clonagem utilizada foi eficiente, permitindo a obtenção de todos os antígenos de *M. hyopneumoniae* selecionados, mesmo sendo um genoma rico em AT (72%) (Vasconcelos et al., 2005), o que de certa forma dificulta o desenho de *primers* e a amplificação dos genes. *E. coli* foi utilizada para expressão de proteínas heterólogas, a qual é considerada um dos mais atrativos sistemas, pelo seu rápido crescimento, utilizando substratos de baixo custo, além de ser o microrganismo mais bem caracterizado geneticamente (Baneyx, 1999). As proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* foram predominantemente expressas na forma

1 insolúvel, consequência da super-expressão destes antígenos, levando a formação
2 de corpúsculos de inclusão, os quais são agregados insolúveis de proteínas
3 (Georgiou & Segatori, 2005). No entanto o protocolo de solubilização com uréia
4 adotado nesse estudo foi eficiente para a obtenção destas proteínas.

5 Sete proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* foram avaliadas em
6 camundongos como vacinas de subunidade, quanto a suas características
7 imunogênicas e antigênicas. Análise da resposta de anticorpos no soro de
8 camundongos vacinados revelou que todas elas foram capazes de induzir uma
9 resposta imune humoral específica. A proteína 665, uma proteína hipotética,
10 destacou-se entre as demais, apresentando a melhor resposta tanto no ELISA
11 indireto, quanto no ELISA com extrato de célula de *M. hyopneumoniae*, sugerindo
12 que este antígeno possa ser um importante candidato em formulações de vacinas.
13 Chen et al. (2008), avaliando a resposta imune em camundongos, de potenciais
14 antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae* fornecidos como um coquetel de
15 DNA e de proteínas recombinantes, obtiveram uma forte resposta de IgG no grupo
16 inoculado com o coquetel de proteínas, e uma menor resposta quando inoculados
17 com o coquetel de DNA, mas a imunização com a combinação de ambas as vacinas
18 apresentou uma forte resposta humoral e Th1. No entanto, os mecanismos imunes
19 responsáveis pela proteção contra *M. hyopneumoniae* são complexos e não estão
20 bem esclarecidos (Reynolds et al., 2008). Thacker et al. (2000) sugeriram que a
21 erradicação do patógeno é dependente da presença de anticorpos no soro, e do
22 aumento de imunidade mediada por célula, durante a infecção. Isso revela a
23 importância de ambas as respostas na busca de antígenos promissores. Estudos
24 com diferentes vias de inoculação e formulações de vacinas, além de outras
25 formulações de adjuvante, necessitam ser conduzidos para avaliar a indução de uma
26 resposta imune mediada por células com esses alvos, já que todos eles mostraram-
27 se capazes de induzir uma resposta humoral quando avaliados em camundongo.
28 Outra informação importante encontrada, diz respeito ao não reconhecimento destes
29 antígenos pelo soro de animais imunizados com a vacina comercial (dados não
30 apresentados), indicando que estas proteínas podem não estar sendo expressas *in*
31 *vitro*, em cultivos de *M. hyopneumoniae* utilizados para a produção de bacterinas.

32 O reconhecimento de proteínas no soro de animais naturalmente infectados
33 indica que estas proteínas estão presentes *in vivo* durante a infecção. Mediante
34 ELISA foi possível demonstrar que todas as proteínas apresentaram uma reação

1 significativa com os soros suínos naturalmente infectados avaliados, quando
2 comparados com o soro dos animais SPF. No entanto, quando analisadas por
3 *Western blot*, foi possível destacar duas proteínas das demais, a 924 uma proteína
4 hipotética e a 747N, uma provável ICEF- II. Estes antígenos foram capazes de
5 reconhecer anticorpos em sete dos dez soros avaliados. A produção de proteínas
6 recombinantes de *M. hyopneumoniae* em *E. coli*, tem sido sugerida como alternativa
7 não somente para produção de vacinas, mas também para testes de diagnóstico da
8 PES. Alguns estudos têm demonstrado que proteínas recombinantes são capazes
9 de reconhecer anticorpos contra *M. hyopneumoniae* por ELISA (Jang & Kim, 2007;
10 Okada et al., 2005). Esta técnica é considerada útil para a detecção de anticorpos
11 contra este microrganismo, pelo seu baixo custo, fácil execução e possibilidade de
12 análise de um grande número de amostras em curto espaço de tempo (Sibila et al.,
13 2008). Isso viabiliza a realização de diagnóstico de rebanhos, a fim de monitorar a
14 incidência da PES e detectar a presença da doença antes mesmo do aparecimento
15 dos sinais clínicos e ocorrência de significativas perdas econômicas.

16 No presente trabalho foi possível demonstrar que oito proteínas
17 transmembrana de *M. hyopneumoniae*, até então não estudadas, são altamente
18 imunogênicas e expressas durante a infecção, sugerindo que as mesmas possam
19 representar antígenos potenciais para o desenvolvimento de novas abordagens
20 vacinais contra a PES, bem como sua utilização em testes diagnósticos.
21 Certamente, a resposta imune de camundongos não pode ser extrapolada, mas os
22 resultados obtidos justificam investigações adicionais em experimentos de desafios
23 em suínos.

REFERÊNCIAS

- Baneyx, F., 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol 10, 411-421.
- Castro, L.A., Pedroso, T.R., Kuchiishi, S.S., Ramenzoni, M., Kich, J.D., Zaha, A., Vainstein, M.H., Ferreira, H.B., 2006. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. Vet. Microbiol. 116, 258–269.
- Chen, J.R., Liao, C.W., Mao, S.J., Weng, C.N., 2001. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with Pseudomonas exotoxin: in vivo evolution of specific IgG response in mice and pigs. Vet. Microbiol. 80, 347-357.
- Chen, Y.L., Wang, S.N., Yang, W.J., Chen, Y.J., Lin, H.H., Shiuan, D., 2003. Expression and Immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* Heat Shock Protein Antigen P42 by DNA Vaccination. Infect. Immun. 71, 1155- 1160.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Forbes-Faulkner, J., Daggard, G., Mukkur, T.K., 2006. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. J. Med. Microbiol. 55, 923–929.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Daggard, G.E., Mukkur, T.K.S., 2008. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. Vaccine 26, 4372-4378.
- Conceição, F.R., Moreira, A.N., Dellagostin, O.A., 2006. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. Vaccine 24, 5734–5743.
- Debey, M.C. & Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. Infect. Immun. 62, 5312-5318.
- Dybvig, K., Voelker, L.L., 1996. Molecular Biology of Mycoplasmas. Annu. rev. microbial. 50, 25–57.

- 1 Fagan, P.K., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Chin, J., Walker, M.J., 1996. Molecular
2 characterization of a ribonucleotide reductase (*nrdF*) gene fragment of *Mycoplasma*
3 *hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental
4 vaccine for enzootic pneumonia. Infect. Immun. 64, 1060-1064.
- 5 Georgiou, G., Segatori, L., 2005. Preparative expression of secreted proteins in
6 bacteria: status report and future prospects. Curr. Opin. Biotechnol. 16, 538-545.
- 7 Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed
8 mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77,
9 51–59.
- 10 Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A.,
11 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?
12 Vet. Microbiol. 100, 255–268.
- 13 Jang, E.J., Kim, T.J., 2007. In vitro expression of the 50 kDa and 30 kDa fragments
14 of the P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and their use
15 for serodiagnosis. Can. J. Vet. Res. 71, 278-282.
- 16 Jouglard, S.D., Medeiros, M.A., Vaz, E.K., Bastos, R.G., Cunha, C.W., Armoa, R.G.,
17 Dellagostin, O.A., 2002. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method
18 for screening recombinant colonies. Abstracts American Society for Microbiology,
19 H71, p.234.
- 20 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the
21 head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- 22 Lin, J., Weng, C.N., Liao, C.W., Yeh, K.S., Pan, M.J., 2003. Protective effects of oral
23 microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray
24 drying method. J. Vet. Med. Sci. 65, 69–74.
- 25 Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008.
26 Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Vet. Microbiol. 126, 297-
27 309.
- 28 Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006.
29 Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-
30 vaccinated populations. Vaccine 24, 7081-86.

- 1 Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas,
2 G.G., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the
3 agent of swine mycoplasmosis. J. Bacteriol. 186, 7123–7133.
- 4 Okada, M., Asai, T., Futo, S., Mori, Y., Mukai, T., Yazawa, S., Uto, T., Shibata, I.,
5 Sato, S., 2005. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-
6 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and
7 recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 105, 251-
8 259.
- 9 Pinto, P.M., Chemale, G., de Castro, L.A., Costa, A.P., Kich, J.D., Vainstein, M.H.,
10 Zaha, A., Ferreira, H.B., 2007. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma*
11 *hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified
12 and antigenic proteins. Vet. Microbiol. 121, 83-93.
- 13 Rappuoli, R., 2000. Reverse vaccinology. Curr. Opin. Microbiol. 3, 445-450.
- 14 Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of
15 mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1094–1156.
- 16 Reynolds, S.C., St Aubin, L.B., Sabbadini, L.G., Kula, J., Vogelaar, J., Runnels, P.,
17 Peters, A.R., 2008. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the
18 administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at
19 approximately 1 week of age. Vet. J. Article in Press [doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.012](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.03.012)
- 20 Ross, R.F., 1999. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E., D’Allaire, S., Mengeling,
21 W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine, 8th ed. Iowa State University Press,
22 Ames, Iowa, p. 495–505.
- 23 Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3^a ed.
24 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 25 Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Nosaka, H., Mori, Y., 2003. Vaccine efficacy of the
26 attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of
27 *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of
28 swine. Vaccine 21, 532-537.
- 29 Sibila, M., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Segales, J., Valero, O., Espinal, A.,
30 Calsamiglia, M., 2007. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection,

- 1 seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs.
2 Vet. Microbiol. 122, 97-107.
- 3 Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segales, J., 2008.
4 Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma*
5 *hyopneumoniae* infection. Vet. J. Article in press doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020.
- 6 Simionatto, S., Luerce, T.D., Marchioro, S.B., Quevedo, M.F., Dossa, R.G., Ribeiro,
7 S.G., 2006. Mutagênese sítio-dirigida visando a clonagem e expressão de genes de
8 *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Escherichia coli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO
9 DE GENÉTICA, 52, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais....**Foz do Iguaçu: Sociedade
10 Brasileira de Genética, p.896.
- 11 Thacker, E., Thacker, B.J., Kuhn, M., Hawkins, P.A., Waters, W.R., 2000. Evaluation
12 of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a
13 *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. A.J.V.R. 61, 1384–1389.
- 14 Thacker, E.L., 2006. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E., Zimmerman, J.J.,
15 D’Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds). Diseases of Swine, 9th ed. Blackwell Publishing Ltd.
16 Oxford, UK, p.701–717.
- 17 Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto,
18 P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G., Almeida, R., ves-Filho, L., Assuncao, E.N.,
19 Azevedo, V.A., Bogo, M.R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A.,
20 Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A.,
21 Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B.,
22 Dambros, B.P., Dellagostin, O.A., Falcao, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S.,
23 Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S., Frias, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C.,
24 Guimaraes, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F.,
25 Lopes, M.I., Loreto, E.L., Madeira, H.M., Manfio, G.P., Maranhao, A.Q., Martinkovics,
26 C.T., Medeiros, S.R., Moreira, M.A., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolas, M.F.,
27 Oliveira, S.C., Paixao, R.F., Pedrosa, F.O., Pena, S.D., Pereira, M., Pereira-Ferrari,
28 L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C., Santos, F.R., Schmitt, R.,
29 Schneider, M.P., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanez, H.N., Silva,
30 D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares, C.M., Souza, K.R., Souza, R.C., Staats, C.C.,
31 Steffens, M.B., Teixeira, S.M., Urményi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W.,
32 Simpson, A.J., Zaha, A., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome

1 sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of
2 *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. J. Bacteriol. 187,
3 5568-5577.

4 Yang, W.J., Lai, J.F., Peng, K.C., Chiang, H.J., Weng, C.N., Shiuan, D., 2005.
5 Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide
6 libraries and the immune responses of the selected phagotopes. J. Immunol.
7 Methods 304, 15–29.

4. CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- As técnicas utilizadas para clonagem, expressão e purificação foram eficientes para a obtenção de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*.

- A metodologia desenvolvida para mutagênese sítio-dirigida possibilitou a expressão de antígeno de *M. hyopneumoniae* em *E. coli*.

- Todas as proteínas induziram uma resposta imune, quando avaliadas em camundongos.

- As proteínas que foram reconhecidas no soro de suínos naturalmente infectados e que apresentaram uma resposta imune em camundongos são alvos potenciais para serem avaliadas como vacinas de subunidade e/ou em testes sorológicos para diagnóstico da PES.

- Mais estudos são necessários e estão sendo conduzidos para uma melhor caracterização destes alvos, como, por exemplo, a validação de testes diagnósticos e a realização de experimentos de desafio em suínos.

5. REFERÊNCIAS

- AL-HASANI, K.; BOYCE, J.; McCARL, V.P.; BOTTOMLEY, S.; WILKIE, I.; ADLER, B. Identification of novel immunogens of *Pasteurella multocida*. **Microbial Cell Factories**, v.6, p.3, 2007.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.411-421, 1999.
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.246–251, 1999.
- CALUS, D.; BAELE, M.; MEYNS, T.; de KRUIF, A.; BUTAYE, P.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.284–291, 2007.
- CASTRO, L.A.; PEDROSO, T.R.; KUCHIISHI, S.S.; RAMENZONI, M.; KICH, J.D.; ZAHA, A.; VAINSTEIN, M.H.; FERREIRA, H.B. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.258–269, 2006.
- CHEN, J.R.; LIAO, C.W.; MAO, C.N.W. A recombinant chimera 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.
- CHEN, Y.L.; WANG, S.N.; YANG, W.J.; CHEN, Y.J.; LIN, H.H.; SHIUAN, D. 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.; FRY, S.; FORBES-FAULKNER, J.; DAGGARD, G.; MUKKUR, T. 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.; FRY, S.; FORBES-FAULKNER, J.; DAGGARD, G.; MUKKUR, T. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different

- 1 expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice.
- 2 **Veterinary Microbiology**, v.114, p.252–259, 2006b.
- 3 CHEN, A.Y.; FRY, S.; DAGGARD, G.; MUKKUR, T. et al. Evaluation of immune
- 4 response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma*
- 5 *hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in
- 6 mice. **Vaccine**, v.26, p.4372-4378, 2008.
- 7 CHOI, C.; KWON, D.; JUNG, K.; HA, Y.; LEE, Y.H.; KIM, O.; PARK, H.K.; KIM, S.H.;
- 8 HWANG, K.K.; CHAE, C. Expression of inflammatory cytokines in pigs
- 9 experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative**
- 10 **Pathology**, v.134, p.40-46, 2006.
- 11 CLARK, T. G.; CASSIDY-HANLEY, D. Recombinant Subunit Vaccines: Potential and
- 12 Constraints. **Fish Vaccinology**, v.121, p.153-163, 2005.
- 13 CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera
- 14 composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97adhesin with
- 15 *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice.
- 16 **Vaccine**, v.24, p.5734–5743, 2006.
- 17 DEBEY, M.C.; ROSS, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma*
- 18 *hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, v.62,
- 19 p.5312-5318, 1994.
- 20 DJORDJEVIC, S.; EAMENS, G.; ROMALIS, L.; NICHOLLS, P.; TAYLOR, V.; CHIN,
- 21 J. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against
- 22 *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane
- 23 antigen pool and adjuvant. **Australian Veterinary Journal**, v.75, p.504–511, 1997.
- 24 DYBVIG, K.; VOELKER, L.L. Molecular Biology of Mycoplasmas. **Annual Reviews**
- 25 **of Microbiology**, v.50, p.25–57, 1996.
- 26 ERLANDSON, K.R.; EVANS, R.B.; THACKER, B.J.; WEGNER, M.W.; THACKER,
- 27 E.L. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for
- 28 *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal Swine Health and Production**, v.13, p.198–
- 29 203, 2005.
- 30 FAGAN, P.K.; DJORDJEVIC, S.P.; EAMENS, G.J.; CHIN, J.; WALKER, M.J.
- 31 Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (*nrdF*) gene fragment of

- 1 *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an
2 experimental vaccine for enzootic pneumonia. **Infection and Immunity**, v.64,
3 p.1060-1064, 1996.
- 4 FAGAN, P.; WALKER, M.; CHIN, J.; EAMENS, G.; DJORDJEVIC, S. Oral
5 immunization of swine with attenuated *Salmonella* Typhimurium aroA SL3261
6 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the
7 immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial**
8 **pathogenesis**, v.30, p.101–110, 2001.
- 9 GAMBERINI, M.; GOMEZ, R.M.; ATZINGEN, M.V.; MARTINS, E.A.;
10 VASCONCELLOS, S.A.; ROMERO, E.C.; LEITE, L.C.; HO, P.L.; NASCIMENTO,
11 A.L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine
12 Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**, v.244, p.305-313,
13 2005.
- 14 GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative expression of secreted proteins in
15 bacteria: status report and future prospects. **Current Opinion in Biotechnology**,
16 v.16, p.538-545, 2005.
- 17 GLICK, B.R; PASTERNAK, J.J. Molecular biotechnology principles and application
18 of recombinant DNA, 2^a ed. ASM Press, Washington, DC, p.253-255, 1998.
- 19 GRANDI, G. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. **Trends in**
20 **Biotechnology**, v.19, p.181-188, 2001.
- 21 HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.;
22 DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can
23 we expect? **Veterinary Microbiology**, v.100, p.255–268, 2004.
- 24 HO, S.N.; HUNT, H.D.; HORTON, R.M.; PULLEN, J.K.; PEASE, L.R. Site-directed
25 mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v.77,
26 p.51–59, 1989.
- 27 HODGINS, D.; SHEWEN, P.; DEWEY, C. Influence of age and maternal antibodies
28 on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma*
29 *hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, p.10-16, 2004.

- 1 JANG, E.J.; KIM, T.J. In vitro expression of the 50 kDa and 30 kDa fragments of the
2 P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and their use for
3 serodiagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.278-282, 2007.
- 4 JOUGLARD, S.D.; MEDEIROS, M.A.; VAZ, E.K.; BASTOS, R.G.; CUNHA, C.W.;
5 ARMOA, R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid
6 preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American**
7 **Society for Microbiology**, H71, p.234, 2002.
- 8 KOBISCH, M.; FRIIS, N.F. Swine mycoplasmoses. **Review Scientific and**
9 **Technical of the Office International des Epizooties**, v.15, p.1569–1605, 1996.
- 10 KOIDE, S.; YANG, X. H.; HUANG, X. L.; DUNN, J. J.; LUFT, B. J. Structure-Based
11 Design of a Second-Generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-Terminal
12 Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. **Journal of Molecular Biology**, v.350, p.290-
13 299, 2005.
- 14 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
15 bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680–685, 1970.
- 16 LE CARROU, J.; LAURENTIE, M.; KOBISH, M.; GAUTIER-BOUCHARDON, A.V.
17 Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs after
18 Marbofloxacin Treatment and Detection of Mutations in the *parC* Gene.
19 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1959-1966, 2006.
- 20 LE GRAND, A.; KOBISCH, M. Comparaison de l'utilisation d'un vaccin et d'un
21 traitement antibiotique séquentiel dans un élevage infecté par *Mycoplasma*
22 *hyopneumoniae*. **Veterinary Research**, v.27, p.241–253, 1996.
- 23 LILJEQVIST, S.; STÅHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein
24 immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **Journal of**
25 **Biotechnology**, v.73, p.1-33, 1999.
- 26 LIN, J.; WENG, C.; LIAO, C.; YEH, K.; PAN, M. Protective effects of oral
27 microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray
28 drying method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.69–74, 2003.
- 29 MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS,
30 B.; VERBEKE, W.; VIAENE, J.; DE KRUIF, A. Effect of vaccination against

- 1 *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system.
- 2 **Vaccine**, v.17, p.1024–1034, 1999.
- 3 MAES, D.; SEGAL, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESBROUCK, F.
- 4 Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary**
- 5 **Microbiology**, v.126, p. 297-309, 2008.
- 6 MAIONE, D.; MARGARIT, I.; RINAUDO, C. D.; MASIGNANI, V.; MORA, M.;
- 7 SCARSELLI, M.; TETTELIN, H.; BRETTONI, C.; IACOBINI, E. T.; ROSINI, R.;
- 8 D'AGOSTINO, N.; MIORIN, L.; BUCCATO, S.; MARIANI, M.; GALLI, G.;
- 9 NOGAROTTO, R.; DEI, V. N.; VEGNI, F.; FRASER, C.; MANCUSO, G.; TETI, G.;
- 10 MADOFF, L. C.; PAOLETTI, L. C.; RAPPUOLI, R.; KASPER, D. L.; TELFORD, J. L.;
- 11 GRANDI, G. Identification of a Universal Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple
- 12 Genome Screen. **Science**, v.309, p.148-150, 2005.
- 13 MAROIS, C. ; LE, CARROU, J.; KOBISCH, M.; GAUTIER-BOUCHARDON, A.V.
- 14 Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in
- 15 experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v.120,
- 16 p.96–104, 2007.
- 17 MARTELLI, P.; TERRENI, M.; GUAZZETTI, S.; CAVIRANI, S. Antibody response to
- 18 *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal
- 19 antibodies induced by sow vaccination. **Journal Veterinary Medicine B**, v.53, p.229-
- 20 233, 2006.
- 21 MEYNS, T.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A.; CALUS, D.; HAESBROUCK, F.; MAES,
- 22 D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and
- 23 non-vaccinated populations. **Vaccine**, v.24, p.7081–7086, 2006.
- 24 MINION, F.C.; LEFKOWITZ, E.J.; MADSEN, M.L.; CLEARY, B.J.; SWARTZELL,
- 25 S.M.; MAHAIRAS, G.G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae*
- 26 strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v.186,
- 27 p.7123–7133, 2004.
- 28 MORA, M.; BENSI, G.; CAPO, S.; FALUGI, F.; ZINGARETTI, C.; MANETTI, A.G.O.;
- 29 MAGGI, T.; TADDEI, A. R.; GRANDI, G.; TELFORD J.L. Group A *Streptococcus*
- 30 produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T
- 31 antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, p.15641-15646, 2005.

- 1 MORA, M.; DONATI, C.; MEDINI, D.; COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. Microbial
2 genomics and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology
3 approach. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 532-536, 2006.
- 4 MOVAHEDI, R.; HAMPSON, D.J. New ways to identify novel bacterial antigens for
5 vaccine development. *Veterinary Microbiology*, v.131, p.1-13, 2008.
- 6 MYERS, G.S.A.; PARKER, D.; AL-HASANI, K.; KENNAN, R.M.; SEEMANN, T.;
7 REN, Q.; BADGER, J.H.; SELENGUT, J.D.; DEBOY, R.T.; TETTELIN, H.; BOYCE,
8 J.D.; MCCARL, V. P.; HAN, X.; NELSON, W.C.; MADUPU, R.; MOHAMOUD, Y.;
9 HOLLEY, T.; FEDOROVA, N.; KHOURI, H.; BOTTOMLEY, S.P.; WHITTINGTON,
10 R.J.; ADLER, B.; SONGER, J.G.; ROOD, J.I.; PAULSEN, I.T. Genome sequence
11 and identification of candidate vaccine antigens from the animal pathogen
12 *Dichelobacter nodosus*. **Nature Biotechnology**, v.25, p.569-575, 2007.
- 13 OKADA, M.; ASAI, T.; FUTO, S.; MORI, Y.; MUKAI, T.; YAZAWA, S.; UTO, T.;
14 SHIBATA, I.; SATO, S. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a
15 double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody
16 and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary**
17 **Microbiology**, v.105, p.251-259, 2005.
- 18 OKAMBA, F. ; MOREAU, E. ; BOUH, C. ; GAGNON, C. ; MASSIE, B. ; ARELLA, M.
19 Immune responses induced by replication-defective andenovirus expressing the C-
20 terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 adhesin. **Clinical and Vaccine**
21 **Immunology**, v.14, p.767–774, 2007.
- 22 OTAGIRI, Y.; ASAI, T.; OKADA, M.; UTO, T.; YAZAWA, S.; HIRAI, H.; SHIBATA, I.;
23 SATO, S. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples
24 from pigs by nested PCR and culture methods. **The Journal of Veterinary Medical**
25 **Science**, v.67, p.801-805, 2005.
- 26 PARK, S.C.; YIBCHOK-ANUN, S.; CHENG, H.; YOUNG, T.F.; TACKER, E.L.;
27 MINION, F.C.; ROSS, R.F.; HSU, W.H. *Mycoplasma hyopneumoniae* increased
28 intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. **Infection and**
29 **Immunity**, v.70, p.2502–2506, 2002.
- 30 PIFFER, I.A.; FRAZZON, A.P.; COLLARES, R.M.; SCHRANK, A.; SCHARANK, I.S.;
31 SILVA, S.C. Molecular methods applied to the diagnosis mycoplasmal pneumonia in
32 pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.123, 1998.

- 1 PINTO, P.M.; CHEMALE, G.; DE CASTRO, L.A.; COSTA, A.P.; KICH, J.D.;
2 VAINSTEIN, M.H.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B. Proteomic survey of the pathogenic
3 *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-
4 translationally modified and antigenic proteins. **Veterinary Microbiology**, v.121,
5 p.83–93, 2007.
- 6 RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.445-
7 450, 2000.
- 8 RAPPUOLI R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine
9 development. **Vaccine**, v.19, p.2688-2691, 2001.
- 10 RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of
11 mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.1094–1156,
12 1998.
- 13 REYNOLDS, S.C.; ST AUBIN, L.B.; SABBADINI, L.G.; KULA, J.; VOGELAAR, J.;
14 RUNNELS, P.; PETERS, A.R. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks
15 after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at
16 approximately 1 week of age. **The Veterinary Journal**. Article in Press
17 [doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.012](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.03.012), 2008.
- 18 RIBEIRO, F.C.; SILVA, J.C.P.; SANTOS, J.L.; PONTES, K.C.S. Diagnóstico da
19 pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. **Arquivo Brasileiro de**
20 **Medicina Veterinária e Zootécnica**, v.56, p.709-714, 2004.
- 21 RODRÍGUEZ, F.; RAMIREZ, G.A.; SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; LORENZO, H.
22 Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs Naturally
23 Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**,
24 v.130, p.306-312, 2004.
- 25 ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: **Diseases of Swine**. Ed 8^a, Iowa State
26 University Press, Ames, Iowa, p. 495-510, 1999.
- 27 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed.
28 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- 29 SCARSELLI, M.; GIULIANI, M.M.; ADU-BOBIE, J.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. The
30 impact of genomics on vaccine design. **Trends Biotechnology**, v.23, p.84-91, 2005.

- 1 SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.;
2 MASIGNANI, V. Biotechnology and vaccines: application of functional genomics to
3 *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. **Journal of Biotechnology**,
4 v.113, p.15-32, 2004.
- 5 SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R. Post-genomic vaccine development. **FEBS Letters**,
6 v.580, p.2985-2992, 2006.
- 7 SHIMOJI, Y.; OISHI, E.; MUNETA, Y.; NOSAKA, H.; MORI, Y. Vaccine efficacy of
8 the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein
9 of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of
10 swine. **Vaccine**, v.21, p.532–537, 2003.
- 11 SIBILA, M.; NOFRARÍAS, M.; LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; RIERA, P.;
12 LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M. Chronological study of *Mycoplasma*
13 *hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated
14 and non-vaccinated pigs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.97–107, 2007.
- 15 SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.;
16 SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of
17 *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**. Article in Press
18 doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020, 2008.
- 19 SIMIONATTO, S.; LUERCE, T.D.; MARCHIORO, S.B.; QUEVEDO, M.F.; DOSSA,
20 R.G.; RIBEIRO, S.G.. Mutagênese sítio-dirigida visando a clonagem e expressão de
21 genes de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Escherichia coli*. In: CONGRESSO
22 BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais....Foz do Iguaçu:**
23 Sociedade Brasileira de Genética, 2006, p.896.
- 24 SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C.; HIROSE, F. **Pneumonia enzoótica suína**.
25 Goiânia: Art3, 2001, p.44.
- 26 SØRENSEN, V.; AHRENS, P.; BARFOD, K.; FEENSTRA, A.; FELD, N.; FRIIS, N.;
27 BILLE-HANSEN, V.; JENSEN, N.; PEDERSEN, M. *Mycoplasma hyopneumoniae*
28 infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays.
29 **Veterinary Microbiology**, v. 54, p.23–34, 1997.

- 1 STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BUTAYE, P.; MAES, D.; PEETERS, J.; DE KRUIF,
2 A.; HAESEBROUCK, F. The Diversity of *Mycoplasma Hyopneumoniae* Within and
3 between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**,
4 v.109, p.29-36, 2005.
- 5 STÄRK, K. D. C. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk
6 factors on respiratory diseases in swine – A literature review. **Veterinary Journal**,
7 v.159, p.37-56, 2000.
- 8 STRAIT, E.L.; ERICKSON, B.Z.; THACKER, E.L. Analysis of *Mycoplasma*
9 *hyopneumoniae* field isolates. In: **American Association of Swine Veterinarians**
10 **Annual Meeting**, Des Moines, Iowa, p. 95. 2004.
- 11 THACKER, E.; THACKER, B.; BOETTCHER, T.; JAYAPPA, H. Comparison of
12 antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four
13 commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Journal Swine Health and**
14 **Production**, v. 6, p.107–112, 1998.
- 15 THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; KUHN, M.; HAWKINS, P.A.; WATERS, W.R.
16 Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular
17 injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of**
18 **Veterinary Research**, v.61, p.1384–1389, 2000.
- 19 THACKER, E. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research**
20 **Reviews**, v.5, p.317–320, 2004.
- 21 THACKER, E. Mycoplasmal diseases. In: **Diseases of Swine**. 9^a ed. Blacwell
22 Publishing Ltd., Oxford, UK, p.701-717, 2006.
- 23 VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V.; BONATTO, S.L.;
24 CARVALHO, M.O.; PINTO, P.M.; ALMEIDA, D.F.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.;
25 ASSUNÇ, AO, E.N.; AZEVEDO, V.A.; BOGO, M.R.; BRIGIDO, M.M.; BROCCHI, M.;
26 HELIO, A.B.; CAMARGO, A.A; CAMARGO, S.S.; CAREPO, M.S.; CARRARO, D.C.;
27 DE MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.;
28 COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBRO´S, B.P.;
29 DELLAGOSTIN, O.A.; FALCÃO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE,
30 M.S.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.A.; FRÍAS, D.;
31 GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARÃES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM,

- 1 S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.A.; LOPES, M.I.; LORETO, E.L.S.;
- 2 MADEIRA, H.M.F.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.;
- 3 MEDEIROS, S.R.B.; MOREIRA, M.A.M.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.O.;
- 4 NICOLA´S, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXÃO, R.F.C.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.J.;
- 5 PEREIRA, M.; PEREIRA- FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.;
- 6 SALIM, A.C.M.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.C.; SCHRANK, A.;
- 7 SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA,
- 8 S.C.; SOARES, C.M.A.; SOUZA, K.R.L.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS,
- 9 M.B.R.; TEIXEIRA, S.M.R.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO,
- 10 L.W.; SIMPSON, A.J.H.; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete
- 11 genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of
- 12 *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5568–5577, 2005.
- 13 VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; de KRUIF A.;
- 14 HAESEBROUCK, F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field
- 15 isolates. **Veterinary Microbiology**, v.97, p.177–190, 2003.
- 16 VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; de KRUIF, A.;
- 17 HAESEBROUCK, F. *In Vitro* Susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field
- 18 Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.4470-4472, 2004.
- 19 VICCA, J.; MAES, D.; JONKER, L.; de KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F. Efficacy of in-
- 20 feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma*
- 21 *hyopneumoniae* infections. **The Veterinary Record**, v.156, p.606-610, 2005.
- 22 WEICKERT, M.J.; DOHERTY, D.H.; BEST, E.A.; OLINS, P.O. Optimization of
- 23 Heterologous Protein Production in *Escherichia Coli*. **Current Opinion in**
- 24 **Biotechnology**, v.7, p.494-499, 1996.
- 25 ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Identification and characterization of a
- 26 *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. **Infection and Immunity**, v.63, p.1013–
- 27 1019, 1995.
- 28 YANG, W.J.; LAI, J.F.; PENG, K.C.; CHIANG, H.J.; WENG, C.N.; SHIUAN, D.
- 29 Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide
- 30 libraries and the immune responses of the selected phagotopes. **Journal of**
- 31 **Immunological Methods**, v.304, p.15–29, 2005.