

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Resposta imune induzida por antígenos de
Mycoplasma hyopneumoniae avaliados como vacina
de DNA ou subunidade recombinante**

Vanessa Galli

Pelotas, 2011

VANESSA GALLI

RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR ANTÍGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* AVALIADOS COMO VACINA DE DNA OU SUBUNIDADE RECOMBINANTE

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 e Imunologia.

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Co-Orientadora: Simone Simionatto

Pelotas, 2011.

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

G168r Galli, Vanessa

Resposta imune induzida por antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* avaliados como vacina de DNA ou subunidade recombinante / Vanessa Galli. – 103f. : graf. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2011. – Orientador Odir Antônio Dellagostin ; co-orientadora Simone Simionatto.

1.Biotecnologia. 2.*Mycoplasma hyopneumoniae*.
3.Vacina de subunidade. 4.Vacina de DNA. 5.Imunidade humoral. 6.Imunidade celular. I. Dellagostin, Odir Antônio. II.Simionatto, Simone. III.Título.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Seixas, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Fabricio Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

Profa. Dra. Simone Simionatto, Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Claureni e Antoninha que, mesmo estando longe, estiveram sempre muito presentes.

Aos meus irmãos André e Fernanda que prestaram sua companhia e compreensão durante estes dois anos.

Aos demais familiares que sempre apoiaram meus objetivos.

Ao meu orientador, professor Odir pelas oportunidades que me proporcionou.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Simone, Silvana, Charles, Andressa, Clarice e Sérgio, pela atenção e disponibilidade prestada e pela simpatia e brincadeiras que tornavam cada dia de trabalho ainda mais agradável.

A alguém especial, cujo amor, carinho e atenção são incentivos para querer crescer sempre mais.

RESUMO

GALLI, Vanessa. **Resposta imune induzida por antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* avaliados como vacina de DNA ou subunidade recombinante.** 2011. 105f. 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 maior incidência na criação de suínos no mundo. As vacinas disponíveis comercialmente consistem de células inteiras inativadas (bacterina), as quais proporcionam apenas uma proteção parcial e não previnem a colonização pelo microrganismo. Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. Alguns antígenos vêm sendo testados em diferentes sistemas de vacinação, porém nenhum deles foi mais eficiente que as bacterinas comerciais no controle da PES. Este trabalho teve como objetivo a produção e avaliação da antigenicidade e imunogenicidade de antígenos de *M. hyopneumoniae* administrados como vacinas de DNA e/ou subunidade recombinante, visando o desenvolvimento de uma vacina contra a PES. As vacinas de subunidade recombinante foram obtidas através da expressão de onze proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* em *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade, enquanto que as vacinas de DNA foram obtidas pela clonagem de quatro genes de *M. hyopneumoniae* no vetor pcDNA3. A antigenicidade das proteínas recombinantes foi verificada confrontando-as com soro de suínos convalescentes. A imunidade humoral e celular destas vacinas foi avaliada em camundongos imunizados intramuscularmente. Todas as proteínas recombinantes avaliadas foram reconhecidas pelo soro de animais convalescentes, em ensaios de ELISA e/ou *Western blot*, em especial a proteína MHP0418, indicando serem expressas durante o processo infeccioso. Estas proteínas recombinantes, bem como P37, P42, P46 e P95 apresentaram capacidade imunogênica, induzindo ambas as respostas imune Th1 e Th2. As proteínas P37, P42, P46 e P95, e a vacina de DNA pcDNA3/P46 também foram capazes de induzir a expressão de INF γ ,

citocina associada a resposta imune celular e reduzir a expressão de TNF α e IL1, relacionadas com as lesões em suínos, durante infecção por *M. hyopneumoniae*, sugerindo o potencial destas como candidatas vacinais. A estratégia de imunização utilizando proteínas combinadas potencializou a resposta imune, sendo que as proteínas MHP0443 e MHP0372 foram as principais responsáveis pela imunogenicidade induzida pelos Mix1 e Mix2, respectivamente. Além disso, MHP0107, MHP0418 e MHP0372 induziram anticorpos que reagiram especificamente contra proteínas das cepas 7448, 4722 e J de *M. hyopneumoniae*, não apresentando reação cruzada com *M. hyohinis* e *M. flocculare*, podendo, portanto, serem utilizadas em ensaios de imunodiagnóstico.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, vacina de subunidade, vacina de DNA, imunidade humoral, imunidade celular.

ABSTRACT

GALLI, Vanessa. **Immune response elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens evaluated as naked DNA or subunit recombinant vaccines**. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of Porcine Enzootic Pneumonia (PEP), one of the most common respiratory diseases in swine industry worldwide. Commercially available vaccines are inactivated whole-cell preparations (bacterin), which provide only partial protection and do not prevent microorganism colonization. In this context, it is necessary to search new alternatives prophylaxis. Potential antigens are being tested in different vaccination strategies; however none was more efficient than commercial bacterins for PEP control. This work aimed the production and evaluation of antigenicity and immunogenicity of *M. hyopneumoniae* antigens delivered as naked DNA and/or recombinant subunit vaccines, aiming the development of a vaccine against PEP. Recombinant subunit vaccines were obtained by the expression of eleven *M. hyopneumoniae* recombinant proteins in *E. coli* and purification by affinity chromatography, whereas the DNA vaccines were obtained by cloning four *M. hyopneumoniae* genes in pcDNA3 vector. Recombinant proteins antigenicity was verified against convalescent pig serum. The humoral and cellular immune response elicited by these vaccines was evaluated in mice immunized intramuscularly. All recombinant proteins evaluated were recognized by convalescent pig serum, in ELISA and/or *Western blot* assay, especially MHP0418, indicating that they are expressed during disease. These recombinant proteins, as well as P37, P42, P46 and P95 showed immunogenic capacity, eliciting both Th1 and Th2 immune response. The P37, P42, P46 and P95, and the DNA vaccine pcDNA3/P46 were also able to elicit INF γ expression, the cytokine associated with cellular immune response, and decrease TNF α and IL1 expression, both associated with pig lesions, during *M. hyopneumoniae* infection, suggesting their potential as candidate vaccines. The immunization strategy using proteins combined potencialized the immune response, and the MHP0443 and

MHP0372 proteins were the main responsible for the Mix1 and Mix2 immunogenicity, respectively. Moreover, MHP0107, MHP0418 and MHP0372 elicited antibodies that react against proteins from *M. hyopneumoniae* strains 7448, 4722 and J, and did not show cross reaction with *M. hyohinis* and *M. flocculare*. Thus, these proteins could be used in imunodiagnosis assay.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, subunit vaccine, DNA vaccine, humoral immunity, celular immunity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Características gerais de micoplasmas	11
2.2. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	12
2.3. Patologia e Patogenia	14
2.4. Epidemiologia	19
2.5. Diagnóstico.....	22
2.6. Controle da PES.....	26
2.6.1. Vacinas Comerciais.....	27
2.6.2. Desenvolvimento de novas vacinas	30
2.7. Conclusão	35
3. OBJETIVO	36
3.1. Objetivos específicos.....	36
4. ARTIGO 1 - Avaliação da antigenicidade e imunogenicidade em camundongos de proteínas recombinantes secretadas de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> administradas individualmente ou combinadas.....	37
5. ARTIGO 2 - Immune response of selected <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> antigens delivered as recombinant subunit or DNA vaccines.....	63
6. CONCLUSÕES.....	91
7. REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO GERAL

M. hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória crônica endêmica no mundo. Apesar de existirem vacinas comerciais, as mesmas fornecem apenas uma proteção parcial e não previnem a colonização pelo microrganismo (THACKER et al., 1999, 2000; STRAIT et al., 2008). Diferentes antígenos e estratégias vacinais têm sido testados, porém somente dois foram avaliados em ensaio de imunoproteção em suínos com proteção parcial (FAGAN et al., 2000; CHEN et al., 2003). Desta forma, a identificação e caracterização de novos antígenos de *M. hyopneumoniae* representam um passo importante na definição de estratégias alternativas para o controle da PES.

O projeto proposto para execução durante o período de mestrado e apresentado à comissão de orientação desta dissertação foi intitulado “Resposta imune induzida por antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* avaliados como vacina de DNA ou subunidade recombinante” e está inserido no contexto do Projeto Genoma Sul que teve seu início em 2001, com o seqüenciamento do genoma de duas cepas de *M. hyopneumoniae*, um isolado de campo patogênico (cepa 7448) e outra cepa referência (cepa J) (VASCONCELOS et al., 2005).

Nesta dissertação consta uma revisão bibliográfica apontando características gerais do microrganismo foco deste trabalho de mestrado, incluindo aspectos relacionados à sua patogênese, patologia, epidemiologia, métodos diagnósticos e de controle, bem como ao desenvolvimento de vacinas. Os resultados experimentais obtidos até o momento foram apresentados em dois artigos. O artigo intitulado “Avaliação da antigenicidade e imunogenicidade em camundongos de proteínas recombinantes secretadas de *Mycoplasma hyopneumoniae* administradas individualmente ou combinadas” apresenta a avaliação da antigenicidade e imunogenicidade de sete antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* onde todas as proteínas apresentaram antigenicidade quando confrontadas com soro de suínos convalescentes, especialmente a proteína MHP0418. As proteínas MHP0107, MHP0418 e MHP0372 (Lppt) também se mostraram espécie-específicas. Além disso, camundongos imunizados com estas proteínas induziram ambas as resposta imune Th1 e Th2.

A estratégia de imunização utilizando proteínas combinadas foi eficiente, sendo as proteínas MHP0443 e MHP0372 as principais responsáveis pela resposta imune induzida. O segundo artigo constante nesta dissertação, intitulado “Immune response of selected *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens delivered as recombinant subunit or DNA vaccines”, mostra que a imunização intramuscular de camundongos com as proteínas recombinantes P37, P42, P46 e P95, e com a vacina de DNA pcDNA3/P46, administradas individualmente, induziram resposta imune baseada em Th1 e Th2, sugerindo que as mesmas apresentam potencial para compor uma nova vacina contra a PES.

Os objetivos do projeto proposto no plano de trabalho foram alcançados quase na totalidade. Foi possível o desenvolvimento de vacinas de DNA as quais, em ensaio paralelo, foram comparadas com vacinas de subunidade recombinante, avaliando-se resposta imune humoral e celular. Outro desafio importante alcançado neste período foi a padronização e o estabelecimento de cultivo de esplenócitos e avaliação da resposta imune celular por PCR em tempo real, com resultados importantes para a definição de antígenos candidatos ao desenvolvimento de novas estratégias de controle da PES.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais de micoplasmas

Quando os micoplasmas foram inicialmente estudados, seu pequeno tamanho permitia a passagem por microfiltros que bloqueavam outras bactérias. Este evento levou os cientistas a acreditar em que micoplasmas eram vírus. Em 1950 e início dos anos 60 foi estabelecido que micoplasmas são bactérias (FREUNDT et al., 1979). Atualmente, o gênero *Mycoplasma* pertence à Classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales e família Mycoplasmataceae. A nomenclatura é relacionada à ausência de parede celular e do peptidoglicano (WALKER, 2003). Esta característica estrutural proporciona um extremo pleomorfismo às células de micoplasmas, podendo variar de esférico a bacilar e de filamentososo a helicoidal. O diâmetro da forma esférica varia de 0,3 a 0,8 μm e possui uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana (ROSS, 1999). Os micoplasmas infectam células de uma grande variedade de organismos vivos, incluindo humanos, plantas e animais (RAZIN et al., 1998).

Os Mollicutes evoluíram de bactérias Gram positivas, especialmente no que diz respeito àquelas bactérias com DNA contendo baixo conteúdo G+C, através de um processo de evolução reductiva ou degenerativa. Filogeneticamente, esta classe é relacionada aos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (DYBVIK e VOELKER, 1996). Os micoplasmas são os menores microrganismos autoreplicantes de vida livre conhecidos e possuem genomas pequenos (580 a 1.350kb) com alto conteúdo de A+T (aproximadamente 70%). A dinâmica evolucionária destes organismos levou ao acúmulo de mutações deletérias que resultaram na redução do genoma que ocorreu como uma consequência da complementaridade metabólica de seus hospedeiros. O resultado deste processo foi a preservação de um genoma mínimo compreendendo apenas genes essenciais para manter funções básicas e adaptação a ambientes específicos (RAZIN, 2007). Por este motivo, estes organismos possuem capacidades biossintéticas reduzidas, com necessidade de

obter muitos nutrientes de seus hospedeiros. Esta característica ostorna fastidiosos quanto ao cultivo *in vitro* (RAZIN et al., 1998).

Com o menor genoma conhecido, *Mycoplasma* oferece um modelo único para identificar os requerimentos mínimos para o estabelecimento da vida, e explorar o conteúdo funcional de genomas e a relação evolutiva entre eles (KOONIN et al., 1996; GIBSON et al., 2010). Os primeiros esforços para decifrar genomas de Mollicutes foram baseados no mapeamento físico sintetizado de sequências genômicas fragmentadas (BAUTSCH, 1988; LADEFOGED, 1992; FADIEL et al., 2007). Vários genomas de micoplasmas têm sido sequenciados e analisados (HIMMELREICH et al., 1996; HUTCHISON et al., 1999; GLASS et al., 2000; CHAMBAUD et al., 2001; SASAKI et al., 2002; PAPAZISI et al., 2003; JAFFE et al., 2004; MINION et al., 2004; WESTBERG et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005) e, recentemente, um passo importante para a biologia sintética foi alcançado com o desenvolvimento da primeira célula, controlada apenas por genoma sintético, um micoplasma (GIBSON et al., 2010).

2.2. *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória crônica endêmica em todo o mundo. É uma bactéria fastidiosa, cresce lentamente em meio de cultivo Friis enriquecido com soro suíno (FRIIS, 1975), levando de quatro a oito semanas para crescer até níveis mensuráveis, e seu isolamento é difícil devido à freqüente contaminação de outros micoplasmas como o *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma flocculare* (ROSS, 1999). Estas características encarecem a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), utilizadas no controle da PES. Quando cultivado, não produz turbidez no meio de cultivo. Por este motivo, são utilizados métodos alternativos para mensurar o crescimento, os quais incluem a incorporação de substratos como a glucose, arginina ou uréia que são fermentados ou hidrolisados pelo *M. hyopneumoniae*, tornando o meio de cultivo ácido ou alcalino. Estas mudanças de pH são usualmente detectadas através da adição ao meio de cultivo do indicador de pH vermelho de fenol (HANNAN, 2000). As unidades de mudança de cor (CCU) são então mensuradas em espectrofotômetro. Apesar de esta ser a técnica mais rotineira em laboratórios, a

estimação do número de células de micoplasma em meio de cultura é laboriosa e consome tempo. Por isso, recentemente, o crescimento de micoplasma pode ser avaliado em citômetro de fluxo, mostrando-se uma técnica prática e rápida, sendo especialmente importante se aplicada a micoplasmas com crescimento mais lento e/ou com habilidade reduzida em formar colônias, como o *Mycoplasma hyopneumoniae* (ASSUNÇÃO et al., 2007).

Estudos sugerem que *M. hyopneumoniae* apresenta alta heterogeneidade no DNA (KOKOTOVIC et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2005; STAKENBORG et al., 2005, 2006). A tipagem gênica entre isolados de *M. hyopneumoniae* mostrou considerável variabilidade genética: mais de 60% de variabilidade utilizando eletroforese em campo pulsado (PFGE). Da mesma forma, com base no gene P146, isolados de *M. hyopneumoniae* mostraram 50% de variabilidade para amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD), 30% para polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), e 45% para PCR acoplado ao polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (STAKENBORG et al., 2005, 2006).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot* também foram utilizados para estudar a variabilidade entre diferentes isolados de *M. hyopneumoniae*. Foi demonstrada variabilidade intra-espécies utilizando anticorpos contra a adesina P97 (ZHANG et al., 1995; ASSUNÇÃO et al., 2005), a lactato desidrogenase P36 (ASSUNÇÃO et al., 2005), a proteína de fase aquosa P82, a lipoproteína de superfície P65 (KIN et al., 1990), a proteína de membrana integral P70 (WISE e KIM, 1987) e a proteína de membrana de 43 kDa (SCARMAN et al., 1997). Usando SDS-PAGE, o estudo realizado por Calus et al. (2007) demonstrou a existência de mais de 30% de variabilidade entre isolados de *M. hyopneumoniae* de diferentes rebanhos. Estes resultados contrastam com os encontrados por Scarman et al. (1997) que compararam o proteoma total de seis cepas de diferentes regiões geográficas, utilizando SDS-PAGE, e observou que cinco cepas produziram perfis protéicos e antigênicos similares. Da mesma forma, Assunção et al. (2005) comparou 18 isolados de campo de *M. hyopneumoniae* originados de Grã Canária com a cepa referência J, e observou um padrão homogêneo em SDS-PAGE. Porém, em análise de *Imunoblot*, estes autores

demonstraram heterogeneidade antigênica nas diferentes cepas usando anti-soro contra a cepa J.

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

Vários mecanismos têm sido descritos buscando compreender esta variabilidade apresentada por *M. hyopneumoniae*. A presença de número variável de aminoácidos repetidos em tandem (VNTAR) foi observada comparando o genoma completo de *M. synoviae* e de duas diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (7448 e J) em 12 proteínas (quatro adesinas e sete prováveis proteínas de membrana) (VASCONCELOS et al., 2005). Em estudo subsequente, foi demonstrado que estes VNTARs são altamente variáveis entre cinco cepas analisadas. Análise *in silico* também apontou que VNTARs determinam a estrutura provável e variações físicoquímicas e antigênicas nas proteínas correspondentes (CASTRO et al., 2006). Certos eventos genéticos como o *slippage* durante a síntese de DNA podem alterar o número de repetições em *tandem*.

Outro mecanismo importante, responsável pela variabilidade entre cepas é o processamento proteolítico diferenciado de produtos traduzidos, o que tem sido demonstrado na adesina P97 (DJORDJEVIC et al., 2004), na adesina ligadora de glicosaminoglicano P159 (BURNETT et al., 2006), e nas proteínas P216, P146, Lppt, P76, L-Lactato desidrogenase (P36), fator de alongamento Tu (EF-TU), subunidade alfa-E1 da piruvato desidrogenase (PDHA), subunidade beta-E1 da piruvato desidrogenase (PDHB), fosfato acetiltransferase (PTA), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP), proteína de choque térmico 70 (HSP70), adenina forribosiltransferase (APT), uma aminopeptidase, e uma proteína hipotética conservada (PINTO et al., 2007).

2.3. Patologia e Patogenia

A PES é caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente, manifesta-se por tosse seca crônica não produtiva e atraso no ganho de peso, gerando alta morbidade e baixa mortalidade (SOBESTIANSKY;

BARCELLOS; MORES, 1999). Sinais clínicos como febre, anorexia e dificuldade na respiração podem ocorrer na presença de co-infecção com outros patógenos (THACKER et al., 1999). Lesões típicas consistem de uma área bem demarcada da porção crânio-ventral do pulmão, com coloração variando entre preto-avermelhada à violácea ou acinzentada (ROSS, 1999).

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

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

A colonização do hospedeiro pelo *M. hyopneumoniae* é feita através da sua aderência aos cílios do epitélio respiratório. Este microrganismo ataca primeiramente o epitélio ciliado da traquéia, brônquios e bronquíolos, e subsequentemente causa ciliostase e perda da função dos cílios. Desta forma, aumenta a suscetibilidade do animal a infecções secundárias (CIPRIAN et al., 1988; BLANCHARD et al., 1992; RAZIN et al., 1998; THACKER et al., 1999). A indução à perda dos cílios possivelmente ocorre devido ao aumento da concentração intracelular de cálcio livre nas células do epitélio ciliado (PARK et al., 2002). Danos nas células epiteliais também podem ser causados por

toxicidade moderada de produtos do metabolismo, como o peróxido de hidrogênio e radicais de superóxido (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

A adesão deste microrganismo ao epitélio ciliado ocorre por um processo complexo e multifatorial, sendo mediada por, dentre outras, uma adesina designada P97 que possui em sua estrutura uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos localizada na porção C terminal da proteína, referida como região R1, que é altamente imunogênica (ZHANG et al., 1994; ZHANG et al., 1995, HSU e MINION, 1998). Esta proteína apresenta pelo menos dois domínios de ligação à heparina, uma glicosaminoglicana. Esta propriedade de ligar-se a glicosaminoglicanas pode estar relacionada à capacidade da bactéria patogênica evadir o sistema imune hospedeiro e modular a resposta inflamatória do hospedeiro. Portanto, proteínas ligantes de glicosaminoglicanas possivelmente apresentem importante papel no processo infeccioso (JENKINS et al., 2006). A P159, clivada pós-traducionalmente em proteínas de 27, 51 e 110 kDa, também apresenta pelo menos dois domínios de ligação à heparina, o que pode influenciar na interação do microrganismo com o hospedeiro (BURNET et al., 2006). Duas outras proteínas de 28,5 e 54 kDa aparentemente competem pela ligação deste agente aos cílios (CHEN et al., 1992).

Além destes estudos, a análise minuciosa do genoma de três cepas de *M. hyopneumoniae* 232 (MINION et al., 2004), 7448 e J (VASCONCELOS et al., 2005) revelou a presença de um provável elemento integrativo conjugativo (ICE) presente nas duas cepas patogênicas (7448 e 232) e ausente na cepa não patogênica (J). Os resultados sugerem que o ICE é um DNA móvel e provavelmente envolvido em eventos de recombinação genética e na patogenicidade deste microrganismo (PINTO et al., 2007).

A análise proteômica comparativa de cepas patogênica (232) e cepa avirulenta (J) de *M. hyopneumoniae* também demonstrou que a adesina P97, a proteína de 50 kDa derivada da adesina P159 e a proteína de 43 kDa derivada da clivagem proteolítica da P102 mostraram ser expressas em níveis mais elevados na cepa patogênica, sugerindo que participam do processo de infecção (LI et al., 2009). A análise de *microarray* também revelou que os genes correspondentes às proteínas NrdF e P146 apresentam níveis de transcrição aumentados em resposta ao crescimento de *M. hyopneumoniae* em meio de cultivo suplementado

com norepinefrina. Este resultado pode indicar que estas proteínas estejam envolvidas em mecanismos de proteção da bactéria contra estresses e, portanto, desempenham alguma função na sua patogênese (ONEAL et al., 2008). No entanto, apenas a P146 foi reconhecida por soro de suínos convalescentes, indicando ser expressa durante o processo infeccioso (SIMIONATTO, 2008). A proteína P216 também foi caracterizada recentemente (WILTON et al., 2009), onde mostrou ser rapidamente processada gerando P120 e P85, as quais se encontram na superfície de *M. hyopneumoniae*. Como esta proteína parece ser processada de maneira similar entre cepas advindas de diferentes regiões geográficas, este evento parece ser importante para a função desta molécula. Este trabalho também mostrou que P85 é reconhecida por anticorpos antifosfoserina e P216 apresenta capacidade de se ligar a heparina, a cílios de suínos e a células epiteliais semelhantes a de rim de suínos, cultivadas em monocamada. Estes resultados indicam que P120 e P85 desempenham um importante papel na interação de *M. hyopneumoniae* com células do hospedeiro e são componentes importantes da arquitetura de superfície desta espécie. Além disso, P216 foi reconhecida por anticorpos presentes em soro de animais convalescentes e experimentalmente infectados com a cepa patogênica 7448 de *M. hyopneumoniae* (SIMIONATTO, 2008), indicando serem expressos durante a infecção.

A análise comparativa de transcritos advindos do crescimento da cepa patogênica 232 de *M. hyopneumoniae in vitro versus in vivo* indicou que 33 genes sofreram ativação *in vivo* relativo à expressão *in vitro*. No entanto, não foram identificados genes que poderiam estar relacionados à virulência. Mais de 60% dos genes diferencialmente expressos foram classificados como hipotéticos, dos quais talvez haja alguns relacionados à virulência. Além disso, uma grande proporção de genes associados a processos de transporte pela membrana foram ativados *in vivo*, incluindo *secA* (mhp295), *abc* (mhp222), *potA* (mhp380), *eugpA* (mhp381), os quais indiretamente auxiliam na adaptação deste microrganismo, durante a patogênese. *SecA* possivelmente aumentaria a translocação de proteína durante a doença o que proporcionaria uma resposta do sistema imune hospedeiro mais rápida. Ambos, *abc* e *potA*, apresentam motivos de ligação ATP/GTP. *PotA* parece ser um transportador de espermidina, molécula envolvida

na ligação ao ribossomo, atuando no estímulo de tradução e estabilidade do DNA, além de afetar funções imune mediadas pelo óxido nítrico, o que poderia aumentar a sobrevivência do *M. hyopneumoniae in vivo* (MADSEN et al., 2008).

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

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

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

aos-brônquios (BALT) podem ser as responsáveis pela hiperplasia linfóide peribronquiolar durante a PES (LIVINGSTON et al., 1972; MAES et al., 1996; SARRADELL et al., 2003).

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

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

2.4. Epidemiologia

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

A infecção por *M. hyopneumoniae* tem ampla distribuição geográfica e as perdas econômicas decorrentes podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar

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

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

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

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

enquanto os suínos ainda estão colonizados com o patógeno, sendo capazes de infectar outros animais (PIETER et al., 2008).

A transmissão indireta através de fômites tem sido sugerida, mas não é conclusiva. A fonte de infecção mais preocupante ocorre da matriz para a progênie e a transmissão passiva pode ocorrer através de utensílios provenientes de granjas contaminadas (FANO; PIJOAN; DOES, 2005; MEYNS et al., 2006; SIBILA et al., 2008). O conhecimento das rotas de transmissão de *M. hyopenumoniae* e de outros patógenos associados com a PES é necessário para um controle mais efetivo da doença bem como para o entendimento dos fatores que influenciam a patogênese (SIBILA et al., 2008).

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

Um método baseado em MLST para tipagem de *M. hyopneumoniae* diretamente de material clínico apresentou desempenho similar ao método baseado no gene p146, com a vantagem de proporcionar informações filogenéticas. Este trabalho também corroborou que *M. hyopneumoniae* representa uma espécie altamente variável (MAYOR et al. 2008).

Dubosson et al. (2004) usando PCR e seqüenciamento da região codificando para repetições de serina do gene P146, observaram heterogeneidade de *M. hyopneumoniae* em amostras de campo e cepas isoladas com nenhuma associação geográfica forte, mas sugeriu que clones são responsáveis por surtos locais. A técnica de tipagem molecular descrita neste

trabalho quando sozinha ou em associação com tipagem utilizando REP/APC mostrou-se uma ferramenta epidemiológica específica e altamente discriminatória para testar materiais clínicos sem a necessidade de cultivo e isolamento do DNA (MAYOR et al., 2007). A tipagem molecular de *M. hyopneumoniae* é útil para traçar fontes de infecção, um importante passo no controle da pneumonia enzoótica. Permite também levantar dados epidemiológicos e entender melhor as bases biológicas da infecção por este microrganismo.

2.5. Diagnóstico

A investigação e o controle da doença são dependentes de técnicas de diagnóstico apropriadas. Várias metodologias são utilizadas para monitorar infecções por *M. hyopneumoniae*, porém, apresentam limitações. Sinais clínicos e lesões podem ser utilizados como uma tentativa para o diagnóstico desta doença, no entanto, exige observação constante dos animais, o que dispende tempo. Além disso, não é específico, uma vez que os sinais clínicos podem estar relacionados a infecções causadas por outros patógenos (SIBILA et al., 2008). A inspeção em abatedouros é frequentemente utilizada para estimar a incidência de PES no rebanho. O pulmão de pelo menos 30 animais deve ser examinado para determinar uma medida de prevalência e severidade na pneumonia em nível de rebanho. Porém, as lesões causadas por *M. hyopneumoniae* não são patognomônicas (SIBILA et al., 2009).

Desta forma, testes laboratoriais são necessários para um diagnóstico conclusivo da PES (THACKER, 2004). O isolamento a partir de pulmões infectados através de técnicas bacteriológicas é considerado o “padrão ouro” das técnicas de diagnóstico, mas este agente é extremamente difícil de ser isolado devido ao seu crescimento lento e interferência por outros micoplasmas suínos (SIBILA et al., 2008). Testes sorológicos são comumente utilizados para monitorar o *status* sanitário dos rebanhos. A detecção de anticorpos de *M. hyopneumoniae* pode ser realizada através de ELISA, um método automatizado, rápido e barato que fornece informações úteis quanto à presença de 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) (THACKER, 2004). A

comparação dos resultados destes ELISA mostrou que apresentam alta especificidade, mas que a sensibilidade depende do *status* de vacinação e do momento da coleta de amostras (AMERI-MAHABADI et al., 2005; ERLANDSON et al., 2005).

Outros antígenos e variações do ELISA têm sido testados. Okada et al. (2005) utilizaram um anticorpo monoclonal anti-P46 e a proteína recombinante P46 em um ELISA duplo-sanduíche. O teste foi específico para *M. hyopneumoniae*, porém é necessário avaliar se o teste é capaz de diferenciar anticorpos induzidos pela vacina de animais infectados naturalmente. Um ELISA indireto utilizando como antígeno a região N-terminal e C-terminal da P97 foi proposto por Jang e Kim (2007). No entanto, somente a região C-terminal foi considerada adequada para uso como sorodiagnóstico. Recentemente, peptídeos sintéticos correspondendo a quatro diferentes epitopos da lipoproteína mhp366 também foram testados como candidatos para utilização em ELISA, onde foi observada a habilidade de discriminar entre soro de animais referência, positivos e negativos, de animais infectados não-vacinados ou saudáveis, respectivamente (MEENS et al., 2010). Já Feng et al. (2010) baseou-se em uma estratégia diferenciada visando a discriminação de animais infectados de vacinados, desenvolvendo um ELISA (SIgA-ELISA) baseado na região R1 da adesina P97 para detecção de imunoglobulina A secretória contra *M. hyopneumoniae*, tendo encontrado alta correlação (95,8%) entre os resultados por nested-PCR e SIgA-ELISA.

Como o *M. hyopneumoniae* ataca o epitélio ciliado respiratório e tem baixa exposição ao sistema imune, a resposta humoral gerada contra a bactéria é variável e a soroconversão é lenta, não sendo detectado em estágios iniciais da infecção através de sorologia. Outra desvantagem desta técnica é a geração de resultados falso-negativos devido à capacidade deste microrganismo de induzir variação antigênica na sua superfície, resultando em resposta humoral variável. Outros fatores que afetam os níveis de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* incluem a vacinação e infecção corrente com PRRSV (Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva de suínos) (THACKER, 2004). Além disso, os suínos podem ser colonizados com um número baixo de organismos de *M. hyopneumoniae*, sem gerar uma resposta sorológica detectável (THACKER, 2006). Portanto, cuidados devem ser tomados quanto ao uso da sorologia para determinar a ausência do

organismo no rebanho. Quando discrepâncias nos resultados com testes sorológicos são identificados, a técnica de *Western blot* pode ser utilizada para confirmar o resultado (AMERI et al., 2006).

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

Nested-PCR usando dois conjuntos de *primers* para amplificar o gene que codifica para o 16S RNAr de *M. hyopneumoniae* é visto como a técnica mais sensível para detectar a infecção (SIBILA et al., 2008), porém pode resultar em falsos positivos, uma vez que requer cuidados estritos de forma a evitar a contaminação ambiental das amostras. Técnicas para detectar o organismo em tecido fixado usando PCR também estão sendo testadas (KWON e CHAE, 1999). PCR em tempo real sensível e altamente específico baseado em um elemento repetitivo (REP) e no gene codificando um provável transportador ABC também foi avaliado como teste diagnóstico, onde amostras clínicas de *swab* de pulmão e nasal de rebanhos infectados mostraram que aproximadamente 60% das amostras foram positivas para ambos os genes (REP e ABC), 30% foram positivas apenas para ABC e 1% foram positivas apenas para REP (DUBOSSON et al., 2004). Isto indica que diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* estão circulando na população de suínos.

Strait et al. (2008), no entanto, testando cinco diferentes métodos de PCR baseados em 3 genes de *M. hyopneumoniae* observou que eles falharam em detectar todos os isolados deste microrganismo majoritariamente advindos dos Estados Unidos. Neste estudo estavam incluídos os métodos baseados em PCR

em tempo real com os genes ABC e REP previamente publicados por Dubosson et al. (2004) e Mayor et al. (2007) e o nested-PCR de Kurth et al. (2002). Por este motivo, este grupo de pesquisa desenvolveu novos métodos de PCR em tempo real, com os genes mhp165 e mhp183 (adesina P97), os quais foram capazes de detectar todos os isolados testados (STRAIT et al., 2008). Apesar dos avanços alcançados no diagnóstico com PCR, a diversidade genética entre os isolados de *M. hyopneumoniae* tem dificultado a precisão nestes resultados (SIBILA et al., 2008).

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

Além das vantagens e desvantagens de cada método de diagnóstico, a escolha também deve ser baseada na origem do material a ser diagnosticado bem como no grau de infecção. Por exemplo, Moorkamp et al. (2010), observaram que IHC parece ser mais correlacionado com a presença de lesões pulmonares macroscópicas do que em infecções latentes com *M. hyopneumoniae* enquanto que PCR parece ser mais sensível para detectar infecções recentes, incluindo infecções latentes antes de as lesões pulmonares serem detectáveis. Assim, PCR pode ser a melhor escolha se o objetivo foi estabelecer a presença

de infecção o mais breve possível. O diagnóstico de BALF com nested-PCR mostrou-se um método sensível, mas não traz informações sobre a severidade das lesões de pulmão como as avaliações macroscópicas na necropsia e IHC em secção de tecido. A detecção de *M. hyopneumoniae* em BALF por nested-PCR correlaciona-se significativamente com a ocorrência de lesões macroscópicas e histopatológicas típicas. Assim, no caso onde a detecção deste microrganismo não for associada com lesão pulmonar distinta, é devido mais ao estágio inicial de infecção do que com infecção subclínica sem lesão (MOORKAMP et al., 2010).

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

2.6. Controle da PES

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

A diminuição na densidade de animais durante os diferentes estágios de produção mostrou reduzir os níveis de doenças respiratórias. O tamanho do rebanho geralmente é considerado um fator de risco para doenças respiratórias em suínos, devido ao alto risco de introdução de patógenos de outros rebanhos, risco de transmissão de *M. hyopneumoniae* quando o rebanho é grande, e efeito de fatores de manejo e ambientais, relatados em grandes rebanhos. Métodos de

biossegurança como higiene, controle de insetos e roedores, e movimento restrito de pessoas e equipamentos entre animais de diferentes grupos de idade devem ser recomendadas para manter o status sanitário da granja (MAES et al., 2008).

Atenção também deve ser direcionada para as condições ambientais do local onde os animais são acondicionados, como temperatura e circulação de ar (MAES et al., 2008). A prevenção de outras doenças como as do complexo de doenças respiratórias de suínos (PRDC) contribuem para o controle da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* (THACKER et al., 1999). Estudos demonstraram que a infecção simultânea por PRDC aumenta significativamente os níveis de anticorpos em resposta ao *M. hyopneumoniae*, enquanto diminui a eficácia das vacinas (THACKER et al., 1999).

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

2.6.1. Vacinas Comerciais

As vacinas disponíveis comercialmente são compostas por células inteiras inativadas de *M. hyopneumoniae* administradas com adjuvantes. Estas preparações são mundialmente utilizadas no controle das infecções causadas por este patógeno. O principal efeito da vacinação inclui diminuição dos sintomas clínicos, redução no tamanho das lesões pulmonares e melhoria no desempenho

dos suínos (ganho de peso diário e taxa de conversão alimentar) (MAES et al., 1999).

Apesar de não ter sido elucidado completamente o mecanismo exato de proteção desta vacina, sugere-se que a resposta imune celular e a mediada por anticorpos de mucosa sejam importantes para o controle desta doença (THACKER et al., 2000). A imunidade mediada por células (IMC) contra *M. hyopneumoniae*, em resposta à vacinação ou desafio, foi mensurada determinando as respostas proliferativas de linfócitos após estimulação *in vitro* com antígenos específicos de *M. hyopneumoniae*. Os resultados destes estudos indicaram que a resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico foi mais pronunciada em suínos vacinados do que em não vacinados (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1999). Por outro lado, a supressão da resposta de células T por timectomia e tratamento com soro anti-timócito resultou em decréscimo na severidade de lesões microscópicas após desafio, apesar de a multiplicação de *M. hyopneumoniae* ter sido aumentada comparada a suínos imuno-competentes. Este achado sugere que a IMC pode retardar e, ao mesmo tempo, ajudar o desenvolvimento da PES (TAJIMA et al., 1984).

Em estudo realizado por Sibila et al. (2004), as vacinas comerciais preveniram o aumento da concentração de TNF- α no pulmão em resposta ao desafio com *M. hyopneumoniae* e induziram anticorpos específicos no soro contra este microrganismo. A porcentagem de animais que soroconverteram após vacinação aumentou de 30 para 100%. No entanto, nenhuma correlação direta pode ser demonstrada entre a concentração de anticorpos no soro e a proteção contra o desafio com *M. hyopneumoniae* (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1999).

Diferentes estratégias de vacinação têm sido adotadas, dependendo do tipo de rebanho, do sistema de produção, das práticas de manejo, do padrão de infecção e da preferência dos suinocultores. Como a infecção com este microrganismo pode ocorrer já nas primeiras semanas de vida, (VICCA et al., 2002; SIBILA et al., 2007) a vacinação de suínos recém nascidos é comumente utilizada, com a vantagem de induzir imunidade do suíno ser infectado, além de haver menos patógenos que possam interferir na resposta imune. No entanto, pode haver interferência de anticorpos maternos e o risco aumentado de

infecções mais severas de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) quando utilizada esta estratégia. Vacinação de suínos de maternidade tem menor ou nenhuma interferência com possíveis anticorpos maternos, no entanto, neste momento os animais podem já ter sido infectados com *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2008).

Imunização de matriz no final da gestação pode ser realizada visando reduzir a possibilidade de infecção da matriz para os leitões e proteger os leitões via anticorpos maternos (MAES et al., 2008). No entanto, há controvérsias acerca desta proteção. Thacker et al. (2000) sugerem que anticorpos maternos apenas provêm uma proteção parcial contra o desenvolvimento de lesões após desafio e, sob condições experimentais, eles causam limitado ou nenhum efeito sob a colonização por *M. hyopneumoniae*. Em estudo realizado por Sibila et al. (2008), a vacinação das matrizes não afetou a colonização deste microrganismo nos leitões, mas aumentou a porcentagem de leitões soropositivos no desmame e reduziu significativamente a média de lesões pulmonares no abate. Bandrick et al. (2008) sugeriram que linfócitos que são transferidos passivamente de porcas vacinadas para seus leitões (transferência específica) através do colostro são capazes de proliferar e participar na resposta imune contra *M. hyopneumoniae*.

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

Apesar de a vacinação conferir efeitos benéficos na maioria dos rebanhos infectados, os efeitos são variáveis, devido a diferentes fatores como condições impróprias de estocagem das vacinas e de técnicas de injeção, diferença antigênica entre as cepas de campo e as cepas vacinais, presença da doença no momento da vacinação, e a interferência de resposta imune induzida pela vacina

devido a anticorpos do colostro (MAES et al., 2008). Além disso, recentemente tem sido sugerido que a coinfeção com helmintos tais como *Ascaris suum* afeta negativamente a eficácia de vacinas contra *M. hyopneumoniae*, reduzindo os níveis de anticorpos e a soroconversão, e aumentando as lesões pulmonares após desafio com doses relativamente baixas de *M. hyopneumoniae* (STEENHARD et al., 2009).

A vacinação com cepas pouco virulentas de *M. hyopneumoniae* também não protege contra a infecção com uma cepa de alta virulência. Além disso, baseado em parâmetros clínicos e lesões macroscópicas e histopatológicas, parece que a infecção prévia com uma cepa de baixa virulência pode aumentar a severidade da infecção com isolados de alta virulência. Isto implica que a infecção subsequente com diferentes isolados de *M. hyopneumoniae* pode levar a doença clínica mais severa em rebanho de suínos, e que isolados de baixa virulência, como o utilizado no referido trabalho, não são adequados para usar como vacinas vivas (VILLARREAL et al., 2009).

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

2.6.2. Desenvolvimento de novas vacinas

Apesar de existirem vacinas comerciais, as mesmas fornecem apenas uma proteção parcial, uma vez que apenas reduzem a intensidade da infecção e das lesões (THACKER et al., 1999, 2000; STRAIT et al., 2008). Além disso, as mesmas não são produzidas no Brasil, possuem elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente (CHEN; LIAO; MAO, 2001).

Desta forma, a identificação e caracterização de novos antígenos de *M. hyopenumoniae* representam um passo importante na definição de estratégias alternativas para o controle da PES. Com a seqüência genômica de duas cepas referências de *M. hyopneumoniae* 232 (MINION et al., 2004) e *M. hyopneumoniae* J, e de um isolado de campo patogênico *M. hyopneumoniae* 7448 (VASCONCELOS et

al., 2005) disponíveis, é possível a utilização mais racional para identificação de novas proteínas com potencial para o desenvolvimento de vacinas. Ferramentas de bioinformática podem ser utilizadas para prever *in silico* potenciais antígenos. Além disso, esta tem como vantagem identificar proteínas independentemente de sua abundância e sem a necessidade do crescimento do microrganismo *in vitro* (ADU-BOBIE et al., 2003). Os genes selecionados podem ser expressos em sistemas heterólogos, purificados e então serem avaliados quanto ao seu potencial como candidatos vacinais, através de uma estratégia denominada vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2001; CAPECCHI et al., 2004). O pequeno genoma (VASCONCELOS et al., 2005) e o limitado número de proteínas secretadas e de superfície de *Mycoplasma hyopneumoniae* favorecem o uso desta estratégia.

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

Pesquisas com novas abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o desenvolvimento de vacinas mais eficientes no controle da PES, incluindo desde formulações com alimento até vacinas de subunidade e de DNA. A adesina P97 de *M. hyopneumoniae* é o antígeno mais estudado e vários trabalhos utilizando diferentes abordagens já foram descritos. Uma vacina de subunidade recombinante baseada na adesina P97 foi testada, no entanto conferiu apenas uma proteção parcial e não significativa em modelo de infecção de desafio em suínos (KING et al., 1996).

A imunização de camundongos com a porção recombinante R1 da adesina P97 não induziu anticorpos específicos sistêmicos e de mucosa. No entanto, a imunização com a região R1 fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (rLTBR1) induziu em camundongos, anticorpos sistêmicos anti-R1 e de mucosa (IgA). Quando a imunização foi intra-nasal (IN) a resposta imune induzida foi preferencialmente Th1 e quando a via foi intra-muscular (IM) houve indução de resposta Th2 e de mucosa (CONCEIÇÃO et al., 2006). Quando

a região C-terminal da P97 (R1) foi fusionada a toxina A de *Pseudomonas*, camundongos e suínos imunizados com essa vacina de subunidade produziram resposta imune específica composta por IgG contra a R1 (CHEN et al., 2001). Imunização intranasal de suínos com a cepa atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressando a proteína recombinante p97 significativamente reduziu a severidade das lesões de pulmão após desafio. No entanto, aparentemente, não foi observada resposta imune humoral e mediada por células nos suínos imunizados (SHIMOJI et al., 2003). A imunogenicidade de *Salmonella typhimurium* expressando P97R1 sob o controle de sistema de expressão eucariótico e procariótico também foi investigada em camundongos, porém, nenhuma destas duas estratégias de vacinação induziu anticorpos IgA, IgM ou IgG específicos mensuráveis (CHEN et al., 2006). Camundongos imunizados via intranasal com um adenovírus defeituoso expressando a região C-terminal da P97 induziu resposta imune sistêmica Th1/Th2, bem como imunidade local (OKAMBA et al., 2007). A diferença no tipo de imunidade induzida por estes antígenos pode ser influenciada pela diferença na construção vacinal, pela rota de imunização, pelo dobramento correto e/ou outra modificação pós traducional que pode contribuir na habilidade de gerar anticorpos pelo antígeno (PINTO et al., 2007). Estes resultados sugerem que talvez o antígeno P97 possa ser protetor se administrado de uma forma que aumente sua imunogenicidade.

Outra estratégia de vacinação com a proteína P97 foi avaliada. Esta vacina é baseada em adenovirus recombinante defectivo de replicação, codificando a porção C-terminal da adesina P97 (rAdP97c) (OKAMBA et al., 2010). A inoculação intranasal desta vacina foi capaz de induzir resposta imune de mucosa e sistêmica específica em suínos, contra a proteína recombinante P97c e resposta imune celular específica em PBMC. Além disso, reduziu a quantidade de *M. hyopneumoniae* recuperado de tecidos após desafio e resultou em número de neutrófilos menor que o grupo não vacinado, quando avaliado em BALF. Porém, para todos os critérios de proteção avaliados, a vacina comercial Suvaxyn® MH-one vaccine foi superior à rAdP97c, indicando que mais estudos são necessários para melhorar esta estratégia vacinal. A inclusão de outros antígenos de *M. hyopneumoniae* além da proteína P97c, poderia ser testada, visando melhorar estes resultados.

A imunização oral com *Salmonella typhimurium* aroA ASL3261 expressando o antígeno recombinante NrdF (ribonucleoside-diphosphate reductase b chain) induziu significante IgA específico em pulmões de camundongos, resultou em altas taxas de ganho de peso diário e reduziu lesões pulmonares em suínos. No entanto, não foi capaz de induzir anticorpos IgM, IgA ou IgG específicos no soro. Quando essa construção foi avaliada em suínos foi capaz de reduzir as lesões pulmonares causadas pela PES (FAGAN et al., 1996, 2001). Por outro lado, esplenócitos de camundongos vacinados com este mesmo antígenos na forma de vacina de DNA mediada por *Salmonella typhimurium* aroA não produzem concentração significante de IgA, mas produzem níveis significantes de IFN- γ comparado ao grupo controle (estimulado apenas com NrdF). Estes resultados sugerem que uma vacina de DNA mediada por bactéria pode induzir resposta imune celular mais eficientemente do que bactérias expressando antígenos heterólogos (CHEN, et al., 2006).

Além destes estudos, resposta imune com vacinas de DNA foi induzida em camundongos, baseado na expressão da proteína de choque térmico P42 (CHEN et al., 2003). Chen et al. (2008) avaliaram a resposta imune gerada através de diferentes estratégias de imunização, utilizando coquetéis de antígenos compostos pelas proteínas P97, P36, P46 e NrdF (C1) e P97R1, P36, P46 e NrdF (C2). A imunização intramuscular destes dois coquetéis na forma de vacinas de DNA revelou a indução de uma resposta preferencialmente do tipo Th1 (IMC) e a indução de anticorpos IgG específicos apenas contra P46. No entanto, quando estes coquetéis foram administrados subcutaneamente na forma de proteínas recombinantes e na forma de proteínas recombinantes associadas com vacinas de DNA, foram induzidos anticorpos IgG específicos contra todos os antígenos. Surpreendentemente, a imunização com os coquetéis de proteínas recombinantes também induziram uma resposta Th1 pronunciada.

Outras proteínas ainda não foram testadas como antígenos vacinais, porém mostraram-se antigênicas em testes preliminares. As lipoproteínas associadas à membrana e altamente conservadas Mhp387 e Mhp651, por exemplo, foram reconhecidas especificadamente por soro de suíno convalescente através de ELISA e *Western blot*, indicando que são expressas durante a infecção. Além disso, mostraram ser espécie-específicas em experimento de

ELISA utilizando soro de coelho hiperimune, sendo que a proteína Mhp651 apresentou apenas uma reação cruzada com *M. flocculare*. Como estas proteínas são expostas na superfície, elas podem estar envolvidas na patogênese de *M. hyopneumoniae*, portanto, podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de uma vacina (MEENS et al., 2006). A proteína p102, paróloga da proteína p97, também é expressa durante a infecção, e pode apresentar função similar à da p97, auxiliando no processo de adesão aos cílios (ADAMS et al., 2005).

Recentemente nosso grupo de pesquisa clonou em *Escherichia coli* 54 genes que codificam proteínas potenciais para uso como vacinas de subunidade (SIMIONATTO et al., 2009; 2010). Destas, 35 proteínas recombinantes expressas neste sistema heterólogo foram avaliadas quanto à capacidade antigênica e imunogênica (SIMIONATTO, 2008). Para isso, as proteínas foram testadas contra soro de suíno hiperimune e convalescentes através de ELISA e *Western blot*. Neste estudo, todas as proteínas testadas foram reconhecidas por soro de suínos convalescentes, sendo que a P102AB apresentou os maiores títulos, seguida pelas proteínas P42, P42 C-terminal, porção central da P146 (144) e P146 N-terminal (277), indicando serem expressas durante a infecção natural por este patógeno. A resposta imune contra estas proteínas foi também avaliada em camundongos BALB/c através de inoculação intramuscular. P97-Like, P102AB (compreende as regiões central e terminal), P42 e MHP0408 induziram alta resposta imune humoral sistêmica quando comparados a outros antígenos testados, indicando serem candidatos promissores no desenvolvimento de vacinas de subunidade recombinantes. Estes dados representam uma contribuição importante para o desenvolvimento de testes sorológicos mais eficientes e vacinas de subunidade contra a infecção por *M. hyopneumoniae*.

Apesar de diferentes antígenos e diferentes estratégias vacinais terem apresentado resultados promissores, apenas serão válidos quando testados em suínos e induzirem proteção, condição esta ainda não alcançada. Para isto, o entendimento da patobiologia da infecção por *M. hyopneumoniae* e as bases moleculares de patogenicidade deste microrganismo são necessárias.

2.7. Conclusão

O controle efetivo da Pneumonia Enzoótica Suína requer a otimização das técnicas de manejo e monitoramento, de diagnóstico e de vacinação. Estudos vêm sendo desenvolvidos buscando novas alternativas para o diagnóstico e profilaxia desta doença. Diversos antígenos foram caracterizados, porém poucos foram avaliados em ensaio de imunoproteção, sendo que esta não se mostrou satisfatória. Além disso, a resposta imune necessária para gerar esta proteção ainda é desconhecida. Desta forma, é fundamental que novos antígenos capazes de induzir imunidade sejam testados em suínos, visando o desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra a PES e de testes de diagnóstico mais eficientes.

3. OBJETIVO

Avaliar a antigenicidade e especificidade de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e a resposta imune celular e humoral induzida por antígenos apresentados ao sistema imune como vacinas de DNA e de subunidade recombinante.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Avaliação da antigenicidade, especificidade e imunogenicidade das proteínas recombinantes MHP0107, MHP0272, MHP0487, MHP0372, MHP0418, MHP443 e MHP0660 de *M. hyopneumoniae*.

- Amplificar e clonar os fragmentos gênicos correspondentes a estas proteínas em vetor de expressão em *Escherichia coli* (pAE);
- Expressar e purificar as proteínas recombinantes supracitadas em *E. coli*.
- Avaliar a capacidade antigênica, confrontando-as com soro de suínos convalescentes;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular induzida em camundongos por estes antígenos na forma de vacina de subunidade recombinante;
- Avaliar a especificidade destas proteínas confrontando o soro de animais imunizados com lisados das cepas 7448, 7422 e J de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*.

3.1.2. Avaliação da imunidade humoral e celular induzida por vacinas de DNA e subunidade recombinante.

- Expressar e purificar as proteínas recombinantes supracitadas em *E. coli* (vacinas de subunidade recombinante), conforme Simionatto (2008);
- Amplificar e clonar as seqüências gênicas que codificam para as proteínas P37, P42, P46 e P95 de *M. hyopneumoniae* em vetor de expressão em células eucarióticas pcDNA3 (vacinas de DNA);
- Avaliar a expressão gênica das vacinas de DNA em células eucarióticas através de transfecção *in vitro* de células Vero;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular em camundongos induzida pelas vacinas de DNA e subunidade recombinante

4. ARTIGO 1

Avaliação da antigenicidade e imunogenicidade em camundongos de proteínas recombinantes secretadas de *Mycoplasma hyopneumoniae* administradas individualmente ou combinadas

Vanessa Galli^a, Simone Simionatto^{a,b}, Silvana Marchioro^a, Odir Antônio Dellagostin^a

^aLaboratório de Biologia Molecular, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

^bFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brazil

Palavras chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, secreted proteins, immune response

*Autor para correspondência:

Odir Antônio Dellagostin

Laboratório de Biologia Molecular, Núcleo de Biotecnologia,

CDTec - Universidade Federal de Pelotas,

Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas - RS; Brazil.

odir@ufpel.edu.br

Resumo

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória responsável por grandes perdas econômicas. As vacinas disponíveis comercialmente apresentam baixa proteção e elevado custo. Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para a profilaxia da PES é fundamental para a melhoria da sanidade dos suínos. Desta forma, sete proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*, incluindo uma lipoproteína (MHP0372), proteínas hipotéticas (MHP00418, MHP0443 e MHP0660), uma transportadora (MHP0487), uma paróloga (cópia 2) da P102 (MHP0107) e uma paróloga da P97 (MHP0272) foram clonadas, expressas em vetor de expressão em procariótico e avaliadas quanto à antigenicidade, utilizando soro de suínos livres de patógeno específico (SPF), convalescentes e experimentalmente infectados com a cepa patogênica 7448, e quanto à imunogenicidade em camundongos, administradas individualmente ou combinadas. Todas as proteínas recombinantes avaliadas foram reconhecidas pelo soro de animais convalescentes, em ensaios de ELISA e/ou *Western blot*, em especial a proteína MHP0418, indicando serem expressas durante o processo infeccioso. Estas proteínas também se mostraram imunogênicas, especialmente a proteína hipotética MHP0443 e a lipoproteína MHP0372 (Lppt), induzindo resposta humoral mista Th1/Th2, exceto em animais imunizados com MHP0272. A estratégia de imunização utilizando combinação de proteínas potencializou a resposta imune, sendo que a proteína MHP0443 e MHP0372 foram as principais responsáveis pela imunogenicidade induzida pelos Mix1 e Mix2, respectivamente. Além disso, MHP0107, MHP0418 e MHP0372 induziram anticorpos que reagiram especificamente contra proteínas das cepas 7448, 4722 e J de *M. hyopneumoniae*, não apresentando reação cruzada com *M. hyohinis* e *M. flocculare*. Assim, este estudo contribuiu para identificação de alvos promissores para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos e de uma nova vacina contra a PES, além de evidenciar a eficácia da estratégia utilizando proteínas combinadas para a indução de resposta imune em camundongos contra proteínas de *M. hyopneumoniae*.

1 Introdução

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das doenças respiratórias com maior incidência na criação de suínos no mundo. Esta doença é caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, piora nas taxas de conversão alimentar e retardo no crescimento, causando consideráveis perdas econômicas à produção suína (RAZIN et al., 1998; THACKER et al., 1999).

Este agente coloniza o epitélio ciliado respiratório, comprometendo a sua integridade, tornando o suíno suscetível a infecções secundárias e oportunistas (THACKER et al., 1999). A PES é usualmente controlada com o uso de antibióticos e procedimentos de manejo animal, no entanto, a vacinação é considerada a forma mais eficiente de controle (ROSS et al., 1986). A vacina disponível, atualmente comercializada, consiste de células inteiras inativadas, com elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente. Além disso, a mesma confere apenas uma proteção parcial (THACKER et al., 1999, 2000; STRAIT et al., 2008).

A busca por novas alternativas para a profilaxia da PES vem sendo direcionada para potenciais antígenos testados em diferentes estratégias de vacinação, incluindo vacinas de terceira geração baseadas em antígenos nativos da bactéria, em antígenos recombinantes ou em formulações com DNA (CHEN et al., 2003; LIN et al., 2003; OKAMA et al., 2007; CHEN et al., 2008; SIMIONATTO et al., 2010). Porém, o número de antígenos caracterizados até o momento é bastante restrito, sendo somente dois testados em ensaio de imunoproteção em suínos com eficácia de proteção parcial (FAGAN et al., 2000; CHEN et al., 2003).

Os dados gerados com o seqüenciamento, juntamente com análises genômicas e proteômicas subsequentes de cepas patogênicas (7448 e 232) e não-patogênicas (J) de *M. hyopneumoniae* (VASCONCELOS et al., 2005) permitiu a identificação de seqüências codificadoras (CDS) de proteínas antigênicas e/ou envolvidas na patogenicidade deste agente, sugerindo a existência de várias classes de fatores de virulência ainda não identificados, como proteínas envolvidas na secreção e/ou tráfego de moléculas entre o hospedeiro e o patógeno, ou na evasão e modulação do sistema imune (PINTO et al., 2009).

Estas proteínas são alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas (RAPPUOLI, 2001; WASSENAAR e GAASTRA, 2001; CAPECCHI et al., 2004). Além disso, moléculas localizadas na superfície celular são freqüentemente antigênicas e podem estar direta ou indiretamente associadas à adesão no hospedeiro, mecanismo primordial para o desenvolvimento desta enfermidade (VASCONCELOS et al., 2005)

Neste estudo foi avaliada a capacidade imunogênica, em camundongos, de proteínas recombinantes secretadas de *Mycoplasma hyopneumoniae* inoculadas individualmente e/ou combinadas. Além disso, estas proteínas foram avaliadas quanto à antigenicidade utilizando o soro de suínos naturalmente e experimentalmente infectados com este patógeno.

2 Material e Métodos

2.1 Cepas bacterianas e plasmídeos

M. hyohinis, *M. flocculare* e as cepas 7448, 4722 e J de *M. hyopneumoniae*, foram obtidas do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA/EMBRAPA, Concórdia-SC, Brasil). *E. coli* TOP10 foi utilizada como cepa nos procedimentos de clonagem e *E. coli* BL21(DE3) RIL foi utilizadas como cepa de expressão. O vetor Champion pET200D/TOPO His-tag expression vector foi obtido da Invitrogen™. O vetor pAE foi obtido do Instituto Butantan (RAMOS et al., 2004).

2.2 Análise das Regiões Codificadoras (CDS)

As CDS da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (GenBank acesso NC_007332) foram previamente analisadas com o auxílio de programas de bioinformática em estudo realizado por Simionatto et al. (2009), buscando satisfazer aos seguintes critérios: proteínas secretadas; possível envolvimento em aspectos relacionados à patogenicidade e/ou à antigenicidade, e seqüências hidrofílicas com poucos ou nenhum códon para triptofano. Destas, sete CDS de *M. hyopneumoniae* foram selecionadas para o presente estudo: a região C-terminal da paráloga (cópia 2) da proteína P102 (MHP7448_0107), região N-terminal da uma paráloga da proteína P97 (MHP7448_0272), uma provável

proteína transportadora de Mg^{2+} (MHP7448_0487), a lipoproteína Lp_{pt} (MHP7448_0372), e três proteínas hipotéticas (MHP7448_0418, MHP7448_443 e MHP7448_0660).

2.3 Amplificação das CDS

Os *primers* utilizados foram desenhados com o auxílio do software Vector NTI 10 (Invitrogen™), baseados na sequência genômica de *M. hyopneumoniae* 7448. (Tabela 1). Para mutagênese sítio-dirigida, foram desenhados primers a montante (F) e a jusante (R) do sítio de mutação e dois primers mutagênicos forward (FM) e reverse (RM), conforme Simionatto et al. (2009). Para realização da clonagem no vetor pAE, um sítio de restrição foi adicionado em cada *primer* (Ramos et al., 2004). Primers forward contendo a sequência CACC foram desenhados para realização de clonagem direcional em vetor Champion pET200D/TOPO His-tag expression vector (Invitrogen).

As CDS de *M. hyopneumoniae* foram amplificadas por PCR a partir do DNA cromossomal da cepa 7448. As condições da reação de PCR foram otimizadas conforme segue: volume final de 25 µl contendo 50 ng do DNA genômico, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, 10 pmol de cada *primer*, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia™) e 1× tampão da enzima. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf™), utilizando as seguintes condições: 7 min a 95 °C seguido por 30 ciclos de 60 s a 95 °C, 60 s a 50 °C e 60 s a 72 °C e a extensão final de 7 min a 72 °C. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e purificado utilizando o kit GFX PCR DNA® and Gel Band Purification Kit®, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare™).

2.4 Mutação Sítio-Dirigida

Os alvos MHP0418 e MHP0372 foram submetidos à mutagênese sítio-dirigida através da técnica de PCR-*overlapping* conforme Simionatto et al. (2009). O produto de cada reação de PCR realizada foi confirmado quanto a sua pureza em gel de agarose 1%. O resultado da mutação foi confirmado através de seqüenciamento (MegaBACE 1000 DNA sequencer - GE Healthcare™) utilizando DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit®.

Tabela 1. CDS de *M. hyopneumoniae* selecionados, respectiva função, *primers* utilizados para amplificação e mutação sítio-dirigida e região clonada.

CDS*	Função	Região clonada (resíduo de aminoácido)	Primers
MHP0107	Proteína P102 (cópia 2)	646 - 948	F: 5' <u>CACCGGATCC</u> GATCAAAAAGCAGATCGA 3' R: 5'CCCA <u>AAGCTT</u> TTTATTGTTTTATATAATTACTAAT3'
MHP0272	Paróloga da proteína P97	228 – 708	F: 5' <u>CACCGGATCC</u> AAAATAAAAGAAAAATTGTTT3' R: 5' <u>CCGGTACC</u> TCAAGCCCGAACTTT3'
MHP0418	Proteína hipotética	145 - 500	F: 5' <u>CACCGGATCC</u> GAAAATTTAGCGCCATAT3' R: 5'CCCA <u>AAGCTT</u> TCATTTTTTAACTGAAATTGG3' FM: 5'AGGCATTG g TATTCTTTATTAG3' RM: 5'AGAATA c CAATGCCTTTTCAG3'
MHP0443	Proteína hipotética	32 – 510	F: 5' <u>CACCGGGTACC</u> GAAATGATTTTGTCTTTTTG3' R: 5'CCCA <u>AAGCTT</u> TCAGATTCTACCATTAATCTTT3'
MHP0487	Provável transportadora de Mg ²⁺	1 – 280	F: 5' <u>CACCGGATCC</u> GATAAAAAAAGTTCTTTTCTTTT3' R: 5'CCCA <u>AAGCTT</u> TCAAAAAACTCTTGATTTTACGAT3'
MHP0660	Proteína hipotética	1 - 394	F: 5' <u>CACCGGATCC</u> ATAAAAAAATCATCAAAAAT3' R: 5' <u>GGGGTACC</u> TCACAGCCTTAGATTTAAA3'
MHP0372**	Proteína Lppt	497 - 883	F: 5'CACCTTTGATTTTCTTAATTTTTCAACA3' R: 5'TTATTCCATATATTCGCTAAGGA3' FM: 5' TTCCTTGATT g CGATCAAATATA3' RM: 5' TGATCG c CAATCAAGGAATAAATC3'

*Anotação no GenBank da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (NC_007332).

**Alvo submetido à clonagem direcional em vetor Champion pET200D/TOPO His-tag expression vector (Invitrogen), conforme Simionatto et al (2009).

F: *primer forward*, R: *primer reverse*, FM e RM: *primers* internos desenhados para realizar a mutação sítio-dirigida das CDS MHP7448_0418 e MHP07448_0372; nucleotídeos mutados aparecem em negrito e minúsculo.

Nucleotídeos sublinhados representam o sítio de restrição da enzima: GGATCC, AAGCTT, GGTACC correspondem a *Bam*HI, *Hind*III e *Kpn*I, respectivamente;

2.5 Clonagem dos fragmentos gênicos

Os produtos da PCR e os *amplicons* mutados, foram submetidos à clonagem no vetor pAE (Ramos et al., 2004) utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen™). A CDS MHOP0372 foi submetida à clonagem direcional utilizando Champion pET200D/TOPO His-tag expression vector (Invitrogen). O produto da

ligação foi transformado por eletroporação em *E. coli* TOP10 e clones recombinantes foram selecionados e caracterizados por digestão com enzimas de restrição.

2.6 Expressão e teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Os plasmídeos recombinantes foram transformados na cepa de expressão *E. coli* BL21 DE3 RIL competente. O plasmídeo transformado foi cultivado em LB com ampicilina em agitador orbital a 37 °C até $OD_{600} = 0,6$. A indução protéica foi realizada com 0,3 mM de isopropylthio- β -D-galactosidase (IPTG, Invitrogen™) por 3 h. Após a indução, 1 mL de cultura foi centrifugado a $14000 \times g$ por 2 min e o pellet foi ressuspendido em 80 μ l de 0,1 M de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) contendo 20 μ l de tampão de corrida $5 \times$ (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 2% SDS). Após ferver por 10 min, 8 μ l do sobrenadante foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. A expressão das proteínas recombinantes foi visualizada em gel SDS-PAGE corado com *Comassie Blue*.

Para testar a solubilidade das proteínas recombinantes expressas foi retirado um 1 mL de cultura induzida com IPTG e centrifugado a $14000 \times g$ por 2 min. O precipitado foi ressuspendido em 500 μ l de PBS contendo 1 mg ml^{-1} de lisozima e 1 mM de PMSF. As células foram lisadas por sonicação (6×10 s de pulsos) em banho de gelo. As frações protéicas solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) foram separadas por centrifugação a $10.000 \times g$ por 5 min. Ambas as frações foram submetidas a SDS-PAGE 12% para identificação da localização da proteína.

2.7 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram expressas em 500 mL de meio de cultivo LB e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema automatizado de cromatografia líquida ÄKTAPrime® (GE Healthcare™). A pureza das proteínas recombinantes purificadas foi verificada em SDS-PAGE 12%. As proteínas foram solubilizadas em solução contendo 20 mM Na_2HPO_4 , 0,5 M NaCl, 2,46 mM Imidazole e 0,2% Lauroil sarcosine, e submetidas a diálise em solução tampão

(pH 8,0) contendo 100 mM Tris e 150 mM NaCl para remoção dos sais e promoção do dobramento das proteínas. A concentração protéica obtida no final deste processo foi determinada usando o kit *BCA[®] Protein Assay* (Pierce[™]). A confirmação da identidade das proteínas recombinantes purificadas foi realizada através de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti cauda de histidina (Sigma).

2.8 Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes

Para avaliar a antigenicidade das proteínas de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli*, foram realizados ensaios de *Western blot* e ELISA utilizando soro de suíno imunizado com a células inteiras inativadas de *M. hyopneumoniae* 7448 (soro hiperimune), soro de suínos convalescentes, com necrópsia positiva para a PES, e soros de suínos livres de patógenos específicos (SPF). Os soros de suínos convalescentes tiveram seu título de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* verificados previamente através de ELISA utilizando o extrato de *M. hyopneumoniae* 7448 como antígeno.

Na técnica de *Western blot*, 2 µg das proteínas recombinantes foram submetidas à SDS-PAGE 12%. Posteriormente, estas proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare[™]), bloqueadas em tampão de bloqueio (leite desnatado 5% em PBS) a 4°C durante a noite. Após serem lavadas em PBS-T (3 x de 5 min cada) foram incubadas em temperatura ambiente por 3 h, com os soros de suínos (1:100 em tampão de bloqueio) previamente adsorvidos em extrato de *E. coli*, visando diminuir reações inespecíficas. Foram testados dois *pools* de cinco soros de suínos convalescentes e um *pool* com cinco soros de suíno SPF Após lavagem com PBS-T (3 x de 5 min cada), foi adicionado o anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (Sigma) (diluído 1:2000 em tampão de bloqueio), incubado em temperatura ambiente por 1 h. As bandas das proteínas imunoreativas foram detectadas com DAB, Tris-HCl 50 mM e NiSO₄ 0,3%.

No ELISA, microplacas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 ng de cada proteína diluída em tampão carbonato/bicarbonato (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6). Após incubação overnight a 4 °C, as placas foram lavadas com PBST (3 x de 5 min cada) e incubadas com 200 µL do tampão de bloqueio a 37

°C por 2 h. Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e incubadas com soro de suíno (1:100 em tampão de bloqueio) a 37 °C por 4 h. Foram testados 36 soros de suínos convalescentes, 4 soros hiperimunes de suínos e 10 soros de suínos SPF. Após outra lavagem, foram incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (Sigma) (1:2000 em tampão de bloqueio) a 37 °C por 1 h. A reação colorimétrica foi gerada com a adição de o-fenilenediamina dihidrocloride (Sigma) e peróxido de hidrogênio. Após 15 min a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de 2 M H₂SO₄. A absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de microplaca (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

2.9 Imunogenicidade das proteínas recombinantes

A imunogenicidade das proteínas recombinantes foi avaliada em camundongos BALB/c fêmeas com 8 a 10 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (Rio Grande do Sul/Brasil). Onze grupos, com cinco animais cada, foram formados randomicamente e imunizados com as proteínas recombinantes: Grupo 1: MHP0107; Grupo 2: MHP0272; Grupo 3: MHP0418, Grupo 4: MHP0487; Grupo 5: MHP0443; Grupo 6: MHP0660; Grupo 7: MHP0372; Grupo 8: associação das proteínas MHP70418, MHP0487 e MHP0443 (Mix1); Grupo 9: associação das proteínas MHP0418, MHP0660 e MHP0372 (Mix2); Grupo 10: imunizado com 100 µL de salina 0,85% (controle negativo); e Grupo 11: imunizado com 100 µL da vacina comercial RespiSure – Pfizer (controle positivo). Foram administradas duas doses intramuscular (IM) com 50 µg das vacinas recombinantes, com intervalo de 21 dias entre cada dose. Nos grupos Mix1 e Mix2, os animais foram imunizados com 16,6 µg de cada proteína. Foi utilizado 15% de hidróxido de alumínio como adjuvante. O sangue destes animais foi coletado do sino retro-orbital em zero (soro pré-imune), 21, 42, 63, 84 e 105 (soro imune) dias pós inoculação. O soro foi obtido através de centrifugação e armazenado a -20 °C até a sua utilização. No dia 105 os animais foram sacrificados. Todos os animais foram mantidos durante o experimento de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

2.9.1 ELISA indireto

O nível de anticorpos contra as proteínas recombinantes no soro dos camundongos imunizados foi verificado por ELISA indireto. Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 ng de cada proteína recombinante; o soro dos camundongos imunizados foram diluídos 1:50; foi utilizado anticorpo anti- IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:4000) para avaliação do título de IgG total, e IsoQuick™ *Kit for Mouse Monoclonal Isotyping* (Sigma) para isotipagem, conforme fabricante. O soro dos animais imunizados com vacinas constituídas de associação de proteínas (Mix1 e Mix2) foi confrontado com uma mistura baseada em quantidades equimolares destas proteínas e com cada uma das proteínas individualmente (ambas totalizando 100 ng de proteína), visando avaliar a contribuição de cada proteína em cada uma das duas vacinas. Os soros dos camundongos foram avaliados individualmente e todas as reações foram realizadas em triplicata.

2.9.2 ELISA de lisado celular

ELISA utilizando extrato celular de *M. hyopneumoniae* foi realizado com o soro dos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes a fim de verificar se os anticorpos induzidos por estes antígenos são capazes de reconhecer proteínas nativas deste microrganismo. Com este fim, 1 µg de extrato de *M. hyopneumoniae* 7448, dissolvido em tampão carbonato/bicarbonato, foi adicionado a cada cavidade de uma microplaca com 96 cavidades. Após incubação overnight a 4 °C e subsequente incubação a -70 °C durante 2 h, as placas foram descongeladas à temperatura ambiente, lavadas com PBST (3 × 5 min) e incubadas com 200 µL de tampão de bloqueio 5% à 37 °C por 2 h. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBST (3 × 5 min) e incubadas com soro dos camundongos imunizados (1:20 em tampão de bloqueio) a 37 °C por 2 h. Após lavar com PBST (3 × 5 min), as cavidades foram incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:4000 em tampão de bloqueio) a 37 °C por 1 h. A reação colorimétrica e a determinação da absorbância foram realizadas de forma similar aos demais testes de ELISA realizados neste estudo. Os soros dos camundongos foram avaliados individualmente e todas as reações foram realizadas em triplicata.

2.10 Western blot com proteínas nativas de *Mycoplasma*

Para verificar a habilidade de anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes avaliadas neste estudo reconhecerem proteínas nativas de micoplasma, lisados das cepas 7448, 7422 e J de *M. hyopneumoniae*, bem como de *M. hyorhinis* e *M. flocculare* foram utilizados em análise de imunoblot. As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra e separadas em SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. As membranas foram bloqueadas overnight a 4 °C em leite desnatado 5% em PBST e, em seguida, incubadas com o pool de cada grupo de animais imunizados (diluído 1:50 em tampão de bloqueio). Anticorpos específicos foram detectados com anti-imunoglobulinas de camundongo produzido em cabra e conjugado com peroxidase (Sigma) e visualizado como descrito no item 2.7. Os soros de animais inoculados com PBS e bacterina comercial foram utilizados com controle negativo e positivo, respectivamente.

2.11 Análise estatística

A média da soroconversão (ELISA de imunogenicidade e isotipagem) e a média da absorbância (ELISA de célula e de antigenicidade) de cada tratamento foram submetidas à análise de variância. O teste Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas ($P < 0,01$) entre as médias dos tratamentos no através do software SAS 9.1 (2004).

3 RESULTADOS

3.1 Clonagem dos alvos, expressão e purificação das proteínas recombinantes

Todas as CDS selecionadas foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de expressão pAE, ou Champion pET200D/TOPO His-tag expression vector (Invitrogen). O códon TGA das proteínas MHP0418 e MHP0372 foi substituído pelo códon TGG, resultado confirmado por seqüenciamento. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) RIL e as respectivas proteínas purificadas do extrato insolúvel de *E. coli*, tornando necessária a

solubilização das mesmas em 8 M uréia. Não foram observadas diferenças na eficiência de clonagem, expressão ou purificação entre os alvo mutados e os demais. As proteínas recombinantes mostraram-se puras em SDS-PAGE e foram capazes de serem reconhecidas por anticorpo anti-histidina em *Western blot* (Figura 1).

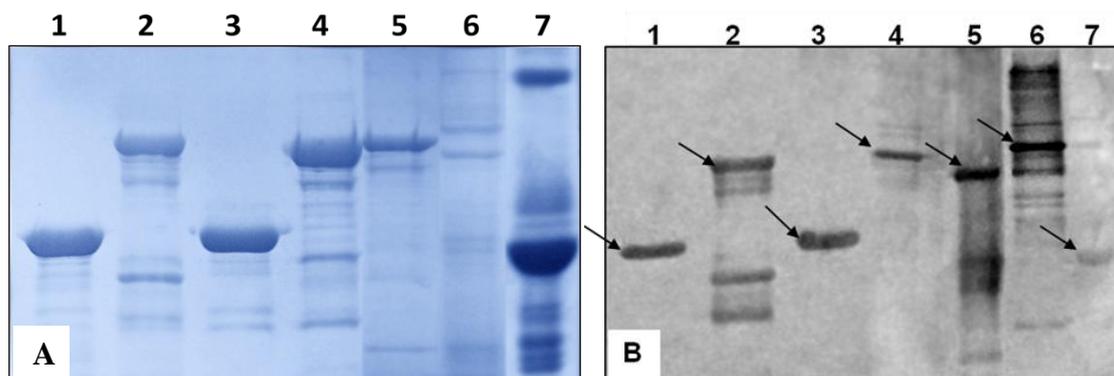


Figura 1. **A.** Eletroforese em SDS-PAGE 12%, corada com Coomassie blue, mostrando as sete proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade. **B.** Análise em *Western blot* das três proteínas recombinantes separadas em 12% SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e confrontadas contra anticorpo anti-histidina (diluído 1:10000) e anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase (diluído 1:2000). Coluna 1, MHP0107 (38 kDa); Coluna 2, MHP0272 (59 kDa); Coluna 3, MHP0418 (37 kDa); Coluna 4, MHP0443 (54 kDa); Coluna 5, MHP0372 (44 kDa); Coluna 6, MHP0660 (48,5 kDa); Coluna 7, MHP0487 (33 kDa). As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes.

3.2 Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes

Todas as proteínas, exceto a MHP0487, foram reconhecidas por soros de suínos convalescentes, quando verificado em *Western blot* (Figura 2A). A proteína MHP0107 reagiu também em presença de soro de suínos SPF (Figura 2B). No ELISA (Figura 3), apenas as proteínas MHP0443 e MHP0660 não apresentaram reatividade estatisticamente significativa quando confrontadas com soro de animais convalescentes e SPF.

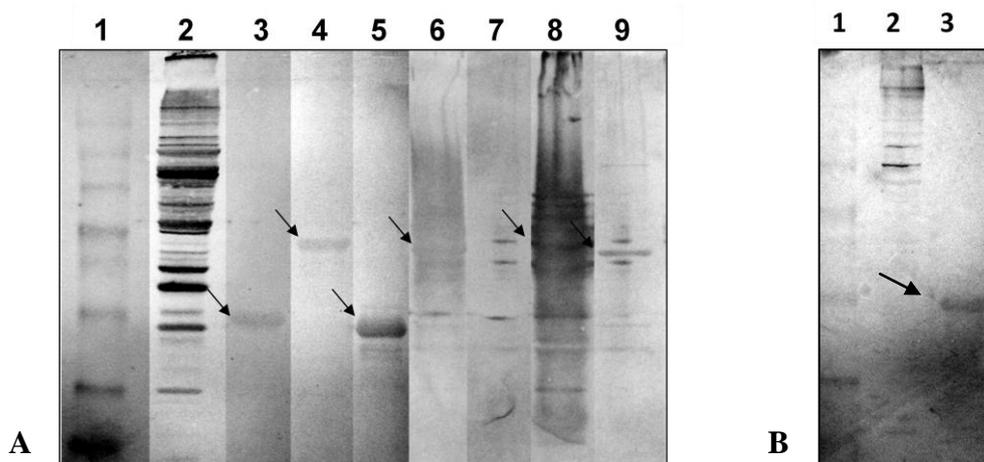


Figura 2. Análise em *Western blot* das proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* confrontadas com: **A:** combinação de soro de cinco suínos convalescentes (diluído 1:100); **B:** combinação de soro de cinco suínos SPF (diluído 1:100). Anti-soro IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:2000) foi utilizado como anticorpo secundário. Coluna 1, Marcador BenchmarkTM Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); Coluna 2, extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448; Coluna 3, MHP0107 (38 kDa); Coluna 4, MHP0272 (59 kDa); Coluna 5, MHP0418 (37 kDa); Coluna 6, MHP0443 (54 kDa); Coluna 7, MHP0487 (33 kDa); Coluna 8, MHP0660 (48.5 kDa); Coluna 9, MHP0372 (44 kDa). As setas indicam as bandas imunoreativas.

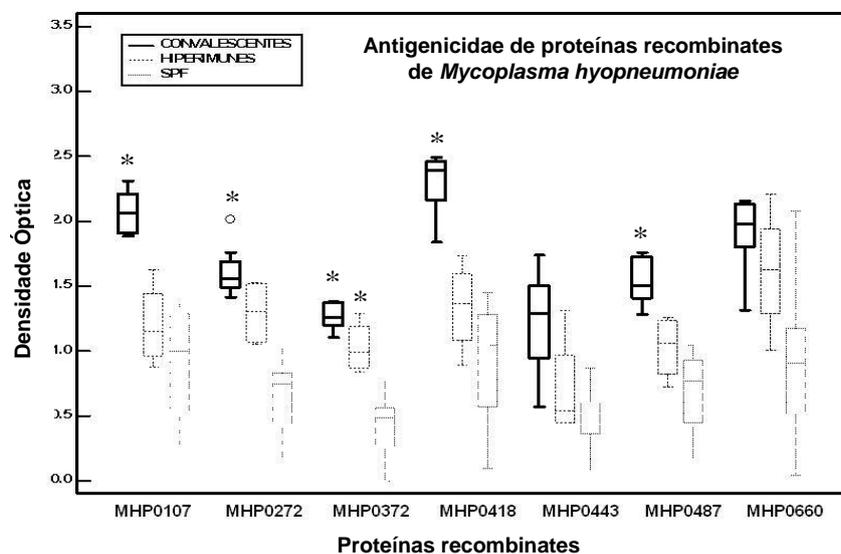


Figura 3. Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes MHP0107, MHP0272, MHP0418, MHP0487, MHP0443, MHP0660 e MHP0372, através de ELISA indireto, utilizando soro de suínos SPF, soro de suínos hiperimunes contra a cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*, e soro de suínos convalescentes, diluídos 1:100. Anticorpo anti-IgG de suíno, conjugado com peroxidase e diluído 1:2000 foi utilizado como anticorpo secundário. A reação colorimétrica foi gerada pela adição de *O-phenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio, e parada com 2 M H₂SO₄. O asterisco indica diferença estatística ($P < 0,01$) quando comparado soro de suínos

convalescentes e SPF ou hiperimune e SPF, de acordo com teste de Tukey. Os dados representam a densidade óptica (492 nm) de 10 soros SPF, 36 soros convalescentes e quatro soros hiperimunes.

3.3 Imunogenicidade das proteínas recombinantes

Quarenta e dois dias após a primeira dose, o soro dos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes apresentou título de anticorpos específicos a estas proteínas, superiores ao soro pré-imune, sendo esta resposta estatisticamente constante até 105 dias após a imunização (dado não apresentado). Os animais inoculados com salina não produziram anticorpos contra as proteínas recombinantes utilizadas neste estudo. O mesmo foi observado com os animais inoculados com a vacina comercial, indicando que estas proteínas não se encontram em quantidades suficientes na formulação da vacina para induzir a geração de anticorpos em camundongos. Todas as vacinas recombinantes diferiram estatisticamente do controle negativo aos 105 dias após imunização (Figura 4 A e B). As proteínas MHP0443 e MHP0372 foram as maiores responsáveis pela resposta imune observada em animais imunizados com as formulações contendo combinação de proteínas (Figura 4B).

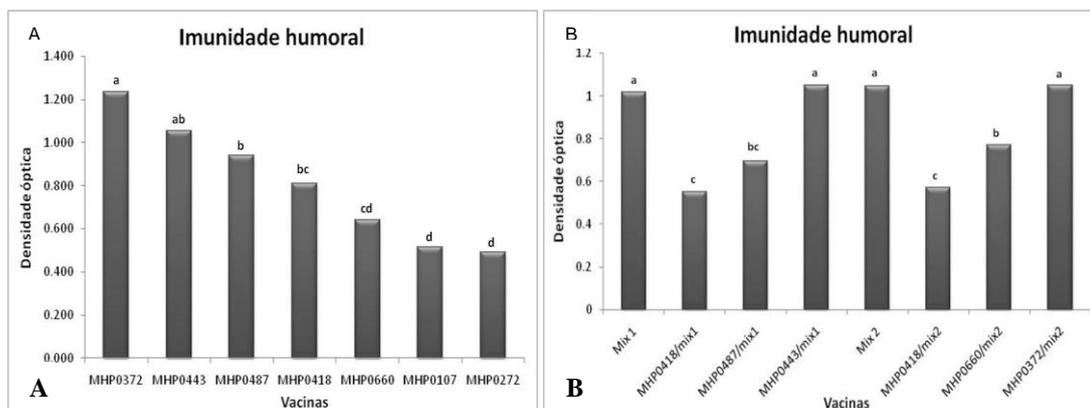


Figura 4. Avaliação da imunogenicidade em camundongos de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* determinada por ELISA indireto. **A.** Soro de animais imunizados (diluídos 1:50) com as proteínas recombinantes MHP0107, MHO0272, MHP0418, MHP0487, MHP0443, MHP0660 e MHP0372, confrontados com 50 µg de cada uma destas proteínas. **B.** Soro de animais imunizados com as associações de proteínas Mix1 e Mix2, os quais foram confrontado com quantidades equimolares das proteínas recombinantes que compõem cada uma das associações de proteínas, totalizando 50 µg, representados pelos grupos Mix1 e Mix2; ou com 50 µg de cada uma destas proteínas recombinantes individualmente, representados pelos grupos

MHP0418/mix1, MHP0443/mix1 e MHP0487/mix1, proteínas que compõem o Mix1, e MHP0418/mix2, MHP0660/mix2 e MHP0372, proteínas que compõem o Mix2. Anticorpo polivalente anti-mouse conjugado com peroxidase (diluído 1:4000) foi utilizado como anticorpo secundário. A reação colorimétrica foi gerada pela adição de *O-phenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio, e parada com 2M H₂SO₄. Os dados referem-se à subtração da densidade óptica (492 nm) individual referente ao dia 105 pela densidade óptica individual referente ao dia 0. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$) entre tratamentos pelo teste de Tukey.

A isotipagem do soro dos animais imunizados mostra que a estratégia de vacinação utilizando combinação de proteínas resultou em maiores títulos de IgG1 e IgG2a, quando comparado com as proteínas administradas individualmente (Figura 5). A maioria dos antígenos induziu predominantemente IgG1 ($P < 0,01$).

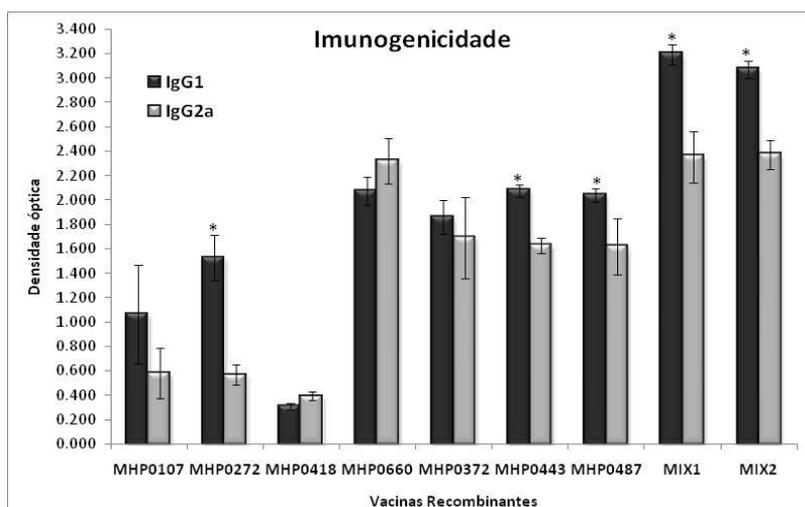


Figura 5. Resposta de anticorpos IgG1 e IgG2a determinada por ELISA, utilizando o kit IsoQuick™ Kit for Mouse Monoclonal Isotyping (Sigma), conforme especificações do fabricante. O soro de camundongos (diluído 1:50) imunizados com as proteínas recombinantes MHP0107, MHP0272, MHP0418, MHP0487, MHP0443, MHP0660 e MHP0372 ou com as associações de proteínas (Mix1 e Mix2), foi utilizado como anticorpo primário. A reação colorimétrica foi gerada pela adição de *O-phenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio, e parada com 2M H₂SO₄. Os dados referem-se a soroconversão obtida através da subtração da densidade óptica individual (492 nm) obtida no dia 105 pela densidade óptica individual obtida no dia zero. O asterisco indica diferença estatisticamente diferente ($P < 0,01$) entre as respostas de IgG1 e IgG2a para cada vacina, conforme teste de Tukey.

3.4 ELISA com lisado celular de *M. hyopneumoniae* como antígeno

Para verificar se os anticorpos produzidos pelos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes são capazes de reconhecer proteínas nativas de *M. hyopneumoniae*, foi realizado ELISA utilizando o lisado de células da cepa 7448 como antígeno. Neste teste, apenas o soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes MHP0418 e MHP0372, e com a vacina comercial (bacterina) reconheceram significativamente as proteínas nativas de *M. hyopneumoniae* 7448, após 105 dias da imunização (soro imune), quando comparado ao soro pré-imune (Figura 6).

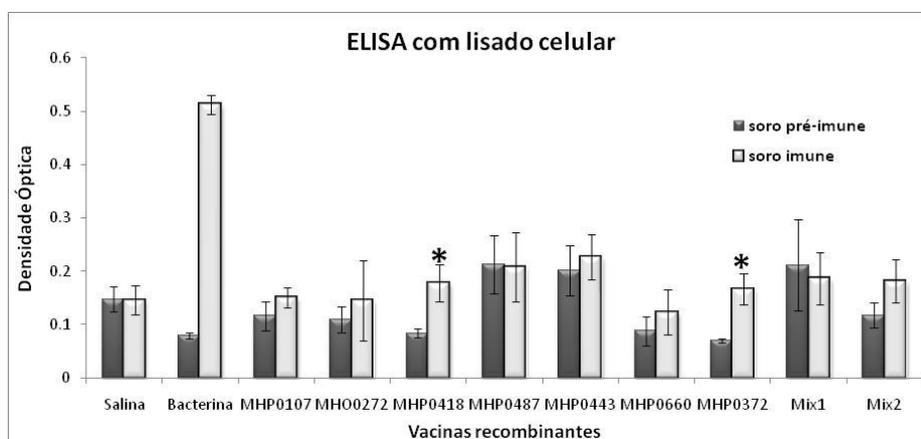


Figura 6. Reatividade em ELISA de proteínas nativas de *M. hyopneumoniae* confrontadas com o sorode camundongos imunizados (diluído 1:20) com as proteínas recombinantes (MHP0107, MHP0272, MHP0418, MHP0487, MHP0443, MHP0660, MHP0372), com duas associações de proteínas (Mix1 e Mix2), com salina (controle negativo) e com a vacina comercial (Bacterina). Anticorpo polivalente anti-mouse conjugado com peroxidase (diluído 1:4000) foi utilizado como anticorpo secundário. A reação colorimétrica foi gerada pela adição de *O*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) e peróxido de hidrogênio, e parada com 2M H₂SO₄. Os dados referem-se à densidade óptica (492 nm) média de cinco animais referente à coleta do dia 0 (soro pré-imune) e à coleta do dia 105 (soro imune). A barra de erro refere-se ao desvio padrão entre os animais avaliados. O asterisco (*) aponta os tratamentos onde houve diferença estatisticamente significativa entre o soro imune e pré-imune ($P < 0,01$) de acordo com teste de Tukey.

3.5 Western blot de proteínas nativas de *Mycoplasma*

A análise por imunoblot utilizando soro de camundongos imunizados com as sete proteínas recombinantes produzidas neste trabalho mostrou que os anticorpos produzidos nestes animais foram capazes de reconhecer proteínas

nativas em lisados celulares de micoplasma. As proteínas MHP0107, MHP0418, MHP0372 induziram anticorpos em camundongos que reagiram especificamente contra proteínas nativas das cepas 7448, 7422 e J de *Mycoplasma hyopneumoniae*. As demais proteínas induziram anticorpos que apresentam reação cruzada com *Mycoplasma hyohynis* e *Mycoplasma flocculare* (Figura 7). O soro de camundongos inoculados com PBS (controle negativo) não reagiu contra estas cepas, enquanto que o soro de camundongos inoculados com uma bacterina comercial (controle positivo) reagiu fortemente em toda a extensão da membrana de nitrocelulose (dados não apresentados).

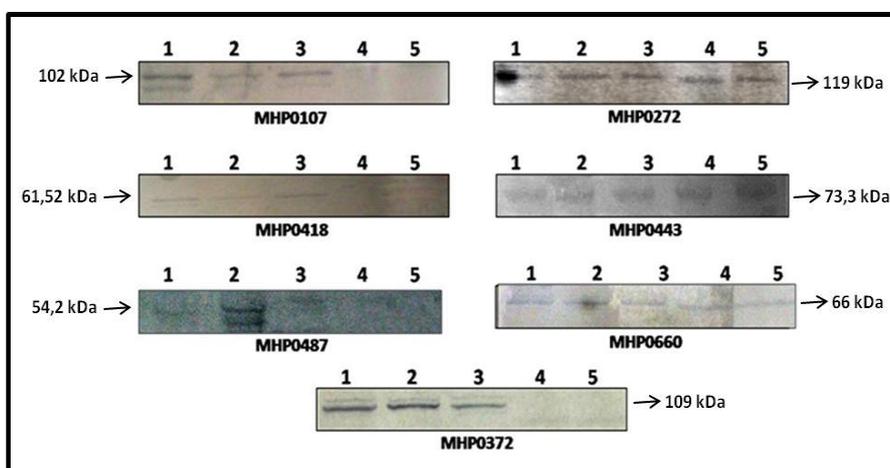


Figura 7. Western blot mostrando o reconhecimento de proteínas nativas de *M. hyopneumoniae* 7448 (Coluna 1), *M. hyopneumoniae* 7422 (Coluna 2), *M. hyopneumoniae* J (Coluna 3), *M. hyohynis* (Coluna 4) e *M. flocculare* (Coluna 5), por anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados (diluído 1:50) com as proteínas recombinantes MHP0107, MHP0272, MHP0418, MHP0487, MHP0443, MHP0660, MHP0372). Anti-imunoglobulina de camundongo, produzido em cabra e conjugado com peroxidase foram utilizadas como anticorpo secundário.

4 Discussão

A identificação e caracterização de novos antígenos de *M. hyopneumoniae* tem representado um passo importante para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade e para a definição de estratégias alternativas para o controle da PES. Neste trabalho, antígenos cuja análise *in silico* demonstrou serem proteínas secretadas e possivelmente com um papel importante na patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, uma vez que são expostas na superfície

do microrganismo, foram caracterizados quanto à antigenicidade e imunogenicidade.

A adesão de *M. hyopneumoniae* no epitélio ciliado respiratório do hospedeiro é uma etapa crucial na patogênese. Este processo é mediado pela interação receptor-ligante, sendo as proteínas (adesinas) envolvidas nesta interação prováveis fatores de virulência. Dentre elas encontram-se as pertencentes ao operon P97/P102, como a proteína MHP0272, a qual é paróloga da P97, o antígeno de superfície mais bem caracterizado de *M. hyopneumoniae*, e a proteína MHP0107 (paróloga da P102), cujo gene encontra-se a jusante do gene que codifica para a P97 e cuja função permanece incerta (ZHANG et al., 1994, 1995; HSU & MINION, 1998). No presente trabalho, as proteínas MHP0107 e MHP0272 foram reconhecidas por anticorpos presentes no soro de suínos convalescentes quando avaliadas através de ELISA. No entanto, a proteína MHP0107 reagiu quando confrontada com soro de suínos SPF (controle negativo), indicando trata-se de uma proteína produzida constitucionalmente pelo *M. hyopneumoniae*. As proteínas MHP0372 (Lppt), MHP0418, MHP0660 e MHP0487 também foram reconhecidas especificadamente quando confrontadas com os soros de suínos convalescentes, em ambos os testes realizados, *Western blot* e ELISA (Figura 1 e 2), indicando que são expressas pela bactéria durante a infecção natural, o que as torna candidatas promissoras para estudos relacionadas ao desenvolvimento de vacinas.

Quando confrontadas com soro de suínos hiperimunes, com exceção da proteína MHP0372, as demais proteínas não foram reconhecidas, possivelmente devido a alterações no perfil de proteínas expressas por *M. hyopneumoniae* em cultivo *in vitro*. A condição desnaturante de ensaios de *Western blot* também pode impedir a exposição de epitopos conformacionais, causando uma reatividade muitas vezes errônea. Em trabalho realizado por Adams (2005), a expressão de genes que codificam para as proteínas P97 e de membros desta família gênica foi verificada em suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* 232. A transcrição simultânea destes genes, associada com possíveis processamentos proteolíticos das proteínas correspondentes, além de mediar a adesão do patógeno resulta em uma série de variantes antigênicos, os quais seriam importantes mecanismos de virulência.

Apesar destas características, a região C-terminal da proteína MHP0107, que corresponde à segunda cópia da P102 no operon, induziu significativamente menores níveis de anticorpos em camundongos do que as demais vacinas avaliadas no presente estudo (exceto MHP0272 e MHP0660), indicando que possivelmente os epitopos relacionados à imunogenicidade encontram-se na região N-terminal. Além disso, a proteína que corresponde à primeira cópia da P102 (MHP0199) foi avaliada quanto à imunogenicidade em camundongos por Simionatto (2008), onde se mostrou imunogênica, tendo se destacado em relação à maioria das proteínas recombinantes avaliadas. Este resultado pode sugerir que os eventos de duplicação que ocorreram evolutivamente originando estas cópias podem ter alterado estas proteínas de forma que apenas a cópia 1 manteve epitopos imunogênicos. Porém maiores estudos são necessários para avaliar esta hipótese.

Ao contrário da MHP0107, as proteínas hipotéticas testadas neste estudo (MHP0443, MHP0660 MHP0418) mostraram-se imunogênicas quando avaliadas em camundongos (Figuras 4 e 5). Em estudo abordando a análise proteômica comparativa entre cepas não patogênicas (J) e patogênicas (7448 e 7422) (PINTO et al., 2007) muitas das proteínas diferentemente expressas entre estas cepas são hipotéticas e, portanto, precisam ser mais bem caracterizadas.

A proteína transportadora MHP0487 e a lipoproteína de superfície MHP0372 (Lppt), cuja capacidade imunogênica ainda não havia sido avaliada, também induziram anticorpos em camundongos. A associação da proteína MHP0372 na citoaderência de *M. hyopneumoniae* já foi previamente demonstrada por Pinto et al. (2007). Além disso, apesar de não ter sido avaliada a função desta proteína no mecanismo de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, sabe-se que MHP0372 apresenta isoformas de cargas em gel 2D, indicando ser modificada pos-traducionalmente. Lipopeptídeos de superfície em micoplasmas, oriundos destas modificações, são conhecidos como uma classe de proteínas que contribuem para processos biológicos de adaptação (BAHRENS et al., 1994; BHUGRA et al., 1996) e patogênicos, como a variação antigênica entre cepas (RAZIN et al., 1998; CALCUTT et al., 1999; DJORDJEVIC et al., 2004).

Apesar de não terem sido elucidados completamente os mecanismos de patogênese do *M. hyopneumoniae*, trabalhos tem sugerido a participação de

ambas as respostas imune celular e humoral durante o processo infeccioso (THACKER et al., 2000). Neste estudo, avaliamos a produção de IgG1 e IgG2a pelos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes. Proteínas recombinantes são conhecidas por induzirem células Th2, culminando na produção de IgG1. Apesar disso, a maioria das proteínas induziu ambos IgG1 e IgG2a, indicando uma resposta mista Th1/Th2 (Figura 5), possivelmente devido sua apresentação na superfície celular.

Alguns estudos também têm relatado a produção de anticorpos contra múltiplos antígenos (CHEN et al., 2008). Neste estudo foram testadas duas associações de proteínas (Mix1 e Mix2), cuja capacidade imunogênica quando avaliadas individualmente foi alta. A análise através de ELISA, utilizando o soro de animais imunizados via intramuscular com estas associações de proteínas demonstrou que houve um aumento significativo no título de IgG total, bem como de IgG1 e IgG2a e, portanto, uma resposta Th1/Th2. As proteínas MHP0443 e MHP0372 foram as principais responsáveis pela resposta imune induzida pelos Mix1 e Mix2, respectivamente (Figura 4B). Porém, anticorpos também foram produzidos contra as demais proteínas presentes na formulação. A administração concomitantemente de diversas proteínas poderia contribuir para a modulação do sistema imune. Além disso, a produção de anticorpos contra um número maior de antígenos aumentaria as chances de reconhecimento do patógeno, potencializando a resposta imune.

Além da busca de antígenos visando o desenvolvimento de vacinas, a caracterização de proteínas recombinantes pode contribuir para a busca de alvos em testes diagnósticos. O uso de antígenos em testes diagnósticos requer que estes não apresentem reações cruzadas com outras espécies de *Mycoplasma*, tornando proteínas específicas de *Mycoplasma hyopneumoniae* de interesse para o desenvolvimento de testes sorológicos. Neste estudo, as proteínas MHP0107, MHP0418 e MHP0372 mostraram-se espécie específicas uma vez que o soro de camundongos imunizados com estas proteínas reagiu quando foi confrontado com o lisado de *M. hyopneumoniae* (cepas 7448, 7422 e J), não reagindo com lisados de *M. hyohynis* e *M. flocculare*. Ferreira & Castro (2007) verificaram que o gene que codifica para a proteína hipotética MHP0418 está presente apenas na

cepa 7448, indicando ser um determinante possivelmente envolvido na virulência, como no caso de ilhas de patogenicidade.

Neste estudo demonstramos a capacidade antigênica e imunogênica, em camundongos, de diferentes proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*, contribuindo para a identificação de antígenos potenciais para uso em testes de imunodiagnóstico e no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a PES. A associação destas proteínas, demonstrou potencializar a resposta imune, sugerindo que esta estratégia poderia resultar na geração de respostas imunológicas distintas, envolvendo imunidade humoral, celular e regulatória, para promover uma vacina realmente eficaz na proteção contra a PES.

5 Referências Bibliográficas

ADAMS, C.; PITZER, J.; MINION, F. C. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.73, p.7784-7787, 2005.

BEHRENS, A.; HELLER, M.; KIRCHHOFF, H.; YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R. A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. **Infection and Immunity**, v.62, p.5075–5084, 1994.

BHUGRA, B.; VOELKER, L. R.; ZOU, N.; YU, H.; DYBVIG, K. Mechanism of antigenic variation in *Mycoplasma pulmonis*: interwoven, site-specific DNA inversions. **Molecular Microbiology**, v.18, p.703–714, 1996.

BRENNER, C.; WROBLEWSKI, H.; LE HENAFF, M.; MONTAGNIER, L.; BLANCHARD, A. Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces t-cell-independent b-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. **Infection and Immunity**, v.65, n.10, p.104322-4329, 1997.

BURNETT, T. A.; DINKLA, K.; ROHDE, M.; CHHATWAL, G. S.; UPHOFF, C.; SRIVASTAVA, M.; CORDWELL, S. J.; GEARY, S.; LIAO, X.; MINION, F. C.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. **Molecular Microbiology**, v.60, p.669-686, 2006.

- 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. R.; FORBES-FAULKNER, J.; DAGGARD, G. E.; MUKKUR T. K. S.. Comparative immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.252–259, 2006.
- CHEN, A. Y.; FRY, S. R.; DAGGARD, G. E.; MUKKUR, T. K.. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. **Vaccine**, v.26, p.4372-4378, 2008.
- CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, A. O. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734–5743, 2006.
- DJORDJEVIC, S. P.; CORDWELL, S. J.; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J.; MINION, F.C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesion. **Infection and Immunity**, v.72, p.2791– 2802, 2004.
- FAGAN, P. K.; WALKER, M.; CHIUN, J.; EAMENS, G. J.; DJORDJEVIC, S. P. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial Pathogenesis**, v. 30, p.101-110, 2001.
- FERREIRA, H. B.; DE CASTRO, L. A. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. **Genetic and Molecular Biology**, v.30, p.245-255, 2007.
- HERBELIN, A.; RUUTH, E.; DELORME, D.; MICHEL-HERBELIN, C.; PRAZ, F. *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4690-4694, 1994.

- HSU, T.; MINION, C. Identification of the Cilium Binding Epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. **Infection and Immunity**, v.66, n. 10, p. 4762-4766, 1998.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença**. 6ª Edição, Artmed, Porto Alegre, 848p, 2007.
- KING, K.; FAULDS, D. H.; ROSEY, E. L.; YANCEY, R. J. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. **Vaccine**, v.15, p.25- 35, 1996.
- LIN, J.; WENG, C. N.; LIAO, C. W.; YEH, K. S.; PAN M. J. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.69–74, 2003.
- MARINARO, M.; STAATS, H. F.; HIROI, T.; JACKSON, R. J.; COSTE, M.; BOYAKA, P. N. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. **Journal of Immunology**, v.155, p.4621–32, 1995.
- MICHAEL, J.; CALCUTT, M. F.; KIM, A. B.; KARPAS, P. F.; UM, H.; KIM, S. W. Differential Posttranslational Processing Confers Intraspecies Variation of a Major Surface Lipoprotein and a Macrophage-Activating Lipopeptide of *Mycoplasma fermentans*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p.760–771, 1999.
- MINION, F. C.; LEFKOWITZ, ELLIOT, J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M.; MAHAIRAS, G. G. The Genome Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 232, the Agent of Swine Mycoplasmosis. **Journal of bacteriology**, v.186, n.21, p.7123–7133, 2004.
- OKAMBA, F. R.; MOREAU, E.; CHEIKH, K.; GAGNON, C. A.; MASSIE, B.; ARELLA, M. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal Portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p. 767-774, n. 6, 2007.
- PINTO, P. M.; CHEMALE, G.; AMARAL DE CASTRO, L.; METZ, A. P.; KICH, J.; VAINSTEIN, M. H.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel

post-translationally modified and antigenic proteins. **Veterinary Microbiology**, v.121, i.1-2, p.83-93, 2007.

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

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1103-1109, 2004.

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

RAZIN, S; YOGEV, D; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62, p.1094–1156, 1998.

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

SEYMOUR, L. M.; DEUTSCHER, A. T.; JENKINS, C.; KUIT, T. A.; FALCONER, L; MINION, F. C.; CROSSETT, B.; PADULA, M.; DIXON, N. E.; DJORDJEVIC, S. P.; WALKER, M. J. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen and swine respiratory cilia. **Biochemistry and Molecular Biology**. Papers in Press. 2010.

SIMIONATTO, S. **Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação**. 2008. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI V.; HARTWIG, D. D.; CARLESSI, R. M.; MUNARI, F. M.; LAURINO, J. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.69, p.132-136, 2010.

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

THACKER, E. L.; HALBUR, P. G.; ROSS, R. F.; THANAWONGNUWECH, R. & THACKER, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.620–627, 1999.

THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; KUHN, M.; HAWKINS, P.A.; WATERS, W.R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.1384–1389, 2000.

VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V. ; BONATTO, S.L.; CARVALHO, M.O.; PINTO, P.M.; ALMEIDA, D.F.; ALMEIDA, L.G.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E.N.; AZEVEDO, V.A.; BOGO, M.R.; BRIGIDO, M.M.; BROCCHI, M.; BURITY, H.A.; CAMARGO, A.A.. CAMARGO, S.S.; CAREPO, M.S.; CARRARO, D.M.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.; LOPES, M.I.; LORETO, E.L.; MADEIRA, H.M.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.; MOREIRA, M.A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.E.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5568–5577, 2005.

WASSENAAR, T. M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiology Letters**, v.201, p.1–7, 2001.

WILTON, J.; JENKINS, C.; CORDWELL, S. J.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; ONEAL, D. C.; DJORDJEVIC, M. A.; CONNOLLY, A.; BARCHIA, I.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S. P. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v.71, p.566-582, 2009.

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

ZHANG, Q.; YOUNG, T. F.; ROSS, R. F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin, **Infection and Immunity**, v.63, p.1013–1019, 1995.

5. ARTIGO 2

Immune response in mice of selected *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens delivered as recombinant subunit or DNA vaccines

Vanessa Galli^a, Simone Simionatto^{a,b}, Silvana Marchioro^a, Fabricio Rochedo Conceição^a, Odir Antônio Dellagostin^a

^aLaboratório de Biologia Molecular, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

^bFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brazil

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, Recombinant protein, DNA vaccine

*Correspondence author:

Odir Antônio Dellagostin

Laboratório de Biologia Molecular, Núcleo de Biotecnologia,

CDTec - Universidade Federal de Pelotas,

Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas - RS; Brazil.

odir@ufpel.edu.br

Abstract

Porcine enzootic pneumonia (PEP) caused by fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is one of the most economically important diseases in the pig industry worldwide. The commercially available vaccine is an inactivated whole-cell vaccine (bacterin), which provides only partial protection and do not prevent microorganism colonization. In this study the cellular and humoral immune response elicited by DNA and recombinant subunit vaccines, comprising P37, P42, P46 and P95 antigens of *M. hyopneumoniae* were evaluated in parallel. All antigens were able to elicit a strong immune response when delivered as subunit vaccine. Among the DNA vaccines evaluated, only pcDNA3/P46 showed promising results for the development of a vaccine, as it induced strong Th1 and Th2 immune responses.

1 Introduction

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of Porcine Enzootic Pneumonia (PEP), one of the most common respiratory diseases in pig farms worldwide. This disease is characterized by a catarrhal with chronic non-productive cough, low feed conversion and delay in weight gain, leading to high morbidity and low mortality (SOBESTIANSKY; BARCELLOS; MORES, 1999).

PEP can be controlled with antibiotics and animal handling procedures. However, vaccination is considered the most efficient way to control (ROSS et al., 1986). The commercially available vaccine is an inactivated whole-cell preparation (bacterin), which provides only partial protection and do not prevent microorganism colonization (THACKER et al., 1998, 2000). In this context, it is necessary to search for new alternative prophylaxis. Potential antigens are being tested in different vaccination strategies in order to develop more effective vaccines, including subunit and DNA vaccines (MURPHY et al., 1993; CHEN et al., 2001, 2003, 2006, 2008; FAGAN et al., 2001; LIN et al., 2003; SHIMOJI et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2006; MEENS et al., 2006; OKAMBA et al., 2007; 2010). Among them, only two have been tested in pig immunoprotection assays, resulting in partial protection (FAGAN et al., 2001; OKAMBA et al., 2010; SHIMOJI et al., 2003).

After the sequencing and proteomic analysis of two additional *M. hyopneumoniae* strains (VASCONCELOS et al., 2005), our research group produced and evaluated the immunogenicity and antigenicity of 35 recombinant proteins expressed in *E. coli* (SIMIONATTO et al., 2008, 2009). Some of them were identified as having potential to be used as vaccine antigens, such as the molecular chaperone DnaK (P42 heat shock protein) and the membrane surface protein P46. The latter have been tested as DNA vaccine, but as part of a cocktail, not separately (CHEN et al., 2003, 2008). Two other recombinant proteins (P37-like ABC transporter substrate-binding lipoprotein and outer membrane protein P95), not previously described, were also considered to be potential antigens to be used as subunit vaccine.

Some studies have reported that DNA vaccines favour the Th1 immune response and thus promote the cellular immune response (BABIUK, 2002; CHEN et al., 2003, 2006). Despite the fact that the mechanism of *M. hyopneumoniae*

pathogenesis has not been completely elucidated, it has been suggested that cell-mediated and mucosal antibodies immune response are important for disease control (THACKER et al., 2000). Furthermore, the expression vector pcDNA3, commonly used in DNA vaccines, was able to induce INF α expression in pigs, which is related to early innate immunity production as well as generation and maintenance of specific immune response (JOHANSSON et al., 2002). Given this, DNA vaccines represent a promising strategy in developing more effective vaccines against PEP.

In this work, cellular and humoral immune responses elicited by selected *M. hyopneumoniae* antigens delivered as DNA or recombinant subunit vaccines were evaluated in mice.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains and plasmids

The *M. hyopneumoniae* strain 7448 was obtained from Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPQA/EMBRAPA, Concórdia-SC, Brasil). *E. coli* TOP10 was used as a host strain for manipulation; *E. coli* BL21(DE3) RIL was used as expression strain. Expression vectors Champion pET200D/TOPO and pcDNA3 were purchased from Invitrogen (USA); expression vector pAE was obtained from Instituto Butantan (RAMOS et al., 2004).

2.2 Amplification of CDSs

The primers used were designed on Vector NTI 10 (Invitrogen™) software, based on *M. hyopneumoniae* strain 7448 genomic sequence (GenBank ® accession NC_007332) (Table 1). For site directed mutagenesis, upstream (For) and downstream (Rev) primers and two mutagenic primers, forward (MF) and reverse (MR), were designed according to Simionatto et al. (2009). To perform the cloning in pAE, pET200D TOPO (Invitrogen™) and pcDNA3.1 (Invitrogen™) vectors, a restriction site was added to each primer. Kozak sequence was added in the forward primers to generate DNA vaccines. The *M. hyopneumoniae* CDS were amplified by PCR. The PCR reaction conditions were as follows: final volume of 25 μ l containing 50 ng *M. hyopneumoniae* genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 2.5

mM MgCl₂, 10 pmol of each primer, 2 units of *Taq* DNA polymerase and 1 × enzyme buffer. The amplification was standardized in a Mastercycler Gradient thermocycler (Eppendorf, Germany) using the following conditions: 7 min at 95 °C followed by 30 cycles of 60 s at 95 °C, 60 s at 50 °C and 60 s at 72 °C and final extension of 7 min at 72 °C. PCR products were subjected to electrophoresis on 1% agarose gel and purified using GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare).

2.3 Site-Directed Mutagenesis

Targets MHP0246 (P37) and MHP0513 (P46), which contained a TGA codon in its nucleotide sequence, were subjected to site-directed mutagenesis by modified PCR-overlapping according to Simionatto et al. (2009). The result of the mutation was confirmed by DNA sequencing using the Dye Terminator DYEnamic ET Cycle Sequencing kit and a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare).

Table 1. *M. hyopneumoniae* CDS selected and the respective primers and restriction enzymes used for cloning and site-directed mutation.

CDS ¹	Features	Primer Forward	Enzymes de restriction
MHP0360 For	P37	CGGGATCCGATCAAAAAGACTGGGAAAATT	<i>Bam</i> HI
MHP0360 For*	P37	CGCGGGATCCAAAAAATGGACTGGGAAAAA	<i>Bam</i> HI
MHP0360 Rev	P37	CGGAATTCCTTAGTTAGATTCTGCATAAATCCG	<i>Eco</i> RI
MHP0360 Rev*	P37	CGGAATTCCTTAGTTAGATTCTGCATAAATCCG	<i>Eco</i> RI
MHP0360 FM	P37	CATTTGCTT G ACTGAAAGCAA	
MHP0360 RM	P37	GCTTTCAGT c CAAGCAAATGAA	
MHP0067 For	P42	CACCATGGCGCTTACAAGACTTAA	
MHP0067 For*	P42	CGCGGGATCCCAACGATGGTTTCAGCAAAAG	<i>Bam</i> HI
MHP0067 Rev	P42	CACCATGGCGCTTACAAGACTTAA	
MHP0067 Rev*	P42	CCGGAATTCCTTAATCCTGCTTGATTTTCAGCA	<i>Eco</i> RI
MHP0513 For	P46	CACCCTCACTCAGCAAG	
MHP0513 For*	P46	CGGGGTACCTCACTATGGAGCAAGCTAAT	<i>Kpn</i> I
MHP0513 Rev	P46	TTAGGCATCAGGATTATCAACATTAGC	
MHP0513 Rev*	P46	CGCGGATCCCTTAGGCATCAGGATTATCAAC	<i>Bam</i> HI
MHP0513 FM	P46	GTCCCAGGAT G GAATTATGGAACT	
MHP0513 RM	P46	ATAATT c CATCCTGGGACATAAACAG	
MHP0099 For	P95	CACCAGCCGTCCTTTTTTTGAAA	
MHP0099 For*	P95	CGCGGGATCCGAAGCATGGGTCCTTTTTTTG	<i>Bam</i> HI
MHP0099 Rev	P95	TGATCAAAGTTTAAAAATCTCAGTTTCT	
MHP0099 Rev*	P95	CCGGAATTCTCAAAGTTTAAAAATCTCAGTTTCTT	<i>Eco</i> RI

¹ NC_007332 GenBank® accession for *M. hyopneumoniae* strain 7448.

*Primers designed for cloning into pcDNA3.1 vector. The others were designed for cloning into pAE or PET200D TOPO. For, forward primer; Rev, reverse primer; FM and RM, internal primers designed for site-directed mutagenesis. Mutated nucleotides are in bold and lowercase. Underlined nucleotides represent the restriction site of the enzyme. Italic nucleotides represent CACC sequence used for site-direct cloning into PET200D TOPO plasmid.

2.4 Cloning of gene fragments for DNA and recombinant subunit vaccine development

The PCR generated fragments were ligated into pcDNA3.1 and pAE expression vectors using T4 DNA ligase (Invitrogen™), or directly into PET200D TOPO. The ligation product was electropoated into *E. coli* TOP10. Recombinant clones were characterized by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis. To obtain the DNA vaccines, recombinant plasmids were expanded in LB broth and plasmid DNA was purified using NucleoBond® Xtra Maxi kit (Macherey Nagel™). Recombinant proteins were obtained from *E. coli*

BL21DE3 Codon Plus RIL by the induction of protein expression with 0.3 mM isopropylthio- β -D-galactosidase (IPTG, Invitrogen™) for 3 h. Recombinant proteins were purified by affinity chromatography on Sepharose columns (HisTrap™) loaded with nickel, using the automated liquid chromatography system AKTAPrime® (GE Healthcare). The purity was verified by 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and concentration was determined by Protein Assay kit BCA™ (Pierce). The recombinant proteins were also characterized by *Western blot* using anti-histidine tag monoclonal antibody conjugated to peroxidase (Sigma).

2.5 *In vitro* transfection of Vero cells

In order to verify the *in vitro* expression of DNA vaccines, *Cercopithecus aethiops* monkey kidney epithelial cells (Vero) were grown in DMEM without antibiotics and supplemented with 10% fetal bovine serum on coverslips affixed on polystyrene plates with six cavities. After 24 h, when cell confluence reached 90%, these cells were washed with DMEM culture medium without serum and transfected with 10 μ g of recombinant vectors pCDNA3/P37, pCDNA3/P42, pCDNA3/P46, pCDNA3/P95 and empty vector pCDNA3, using Lipofectamine™ 2000 according to manufacturer's instructions (Invitrogen). Twenty minutes later, cells were supplemented with DMEM without serum. After 48 h of incubation, the protein expression was assessed by immunofluorescence and semiquantitative PCR. For immunofluorescence, cells were washed with 1 \times PBS, fixed with absolute methanol, washed again with 1 \times PBS and incubated for 1 h at 37 °C with mouse polyclonal serum (1:100 in PBS 1 \times) previously produced against recombinant proteins corresponding to each recombinant vector. After being washed, cells were incubated with polyclonal anti-mouse IgG + IgA + IgM conjugated with FITC (Millipore) (1:200 in 1 \times PBS) for 1 h at 37 °C in a moist chamber. The cells were then stained with Hoechst in moist chamber at 37 °C for 40 min and analysed under a fluorescent microscope. To perform the RT-PCR, total RNA from transfected cells was extracted using Trizol® Reagent (Invitrogen), digested with DNase (Invitrogen) and cDNA synthesized using SuperScript RNA to cDNA kit (Applied Biosystems), according to manufacturer's

instructions (Invitrogen). The semiquantitative PCR was performed with primers originally used to amplify the fragments from the genome (Table 1). The PCR product stained with GelRed™ was observed in 1% agarose gel.

2.6 Inoculation of vaccine formulations in mice

The purified recombinant proteins and DNA vaccines were used to inoculate 6 to 8 weeks old BALB/c mice. Antigens were tested separately in the two vaccination strategies, DNA and subunit vaccines, as follow: Group 1:pcDNA3/P37, Group 2: pcDNA3/P42, Group 3: pcDNA3/P46, Group 4: pcDNA3/P95, Group 5:P37, Group 6:P42, Group 7: P46, Group 8: P95, Group 9: vaccine RespiSure® (Pfizer) (positive control); Group 10: 0.85% saline, supplemented with 15% aluminum hydroxide (negative control for subunit vaccines); and Group 11: pcDNA3 vector (negative control for DNA vaccines). Recombinant subunit vaccines were supplemented with 15% aluminum hydroxide. Two doses were administered intramuscularly (IM) with 50 µg of protein or DNA vaccine with 21 days between each dose. Sucrose (50 µl of 25% solution) was inoculated 30 min before inoculation of DNA vaccines. The blood of these animals was collected from retro-orbital sinum on 0, 21, 42, 63 and 84 days after inoculation (DAI) and serum obtained by centrifugation. After the last blood sample, spleens of these animals were collected in order to evaluate cellular immunity. All animals were maintained during the experiment in accordance with the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation and the Comittee of Etics in Animal Experimentation of UFPel.

2.7 Assessment of the humoral immune response elicited by DNA and recombinant subunit vaccines

The humoral immune response was quantified by ELISA and *Western blot* using sera from immunized animals.

2.7.1 Total IgG and IgG isotyping

Seroconversion generated as a result of immunization with recombinant proteins and DNA vaccines was assessed by ELISA. Microplates of 96 wells were

filled with 100 ng of each recombinant protein per well diluted in carbonate/bicarbonate buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6). After overnight incubation at 4 °C, the plates were washed with PBST (3 × 5 min) and incubated with 200 µl of 5% blocking buffer at 37 °C for 2 h. Subsequently, plates were washed with PBS-T (3 × 5 min) and incubated with serum from immunized mice (1:50 in blocking buffer) at 37 °C for 2 h. After washing with PBS-T (3 × 5 min), plates were incubated with anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase (Sigma) (1:4000 in blocking buffer) 37 °C for 1 h or with the antibodies supported by IsoQuick™ kit (Sigma). The colorimetric reaction was generated by adding o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) and hydrogen peroxide. After 15 min the reaction was stopped by adding 50 µl of 2M H₂SO₄. The absorbance was measured at 492 nm on a microplate reader (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments). Sera from mice were assessed individually and all reactions were performed in triplicate.

2.7.2 Recognition of *M. hyopneumoniae* native proteins

To verify that the serum of immunized mice is able to recognize *M. hyopneumoniae* native protein, ELISA and *Western blot* were performed. For ELISA, one µg of *M. hyopneumoniae* 7448 extract, dissolved in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) was added to each well of a 96 wells microplate. After overnight incubation at 4 °C and subsequent incubation at -70 °C for 2 h, the plates were thawed at room temperature, washed three times with PBS-T and incubated with 200 µl of 5% blocking buffer at 37 °C for 2 h. Subsequently, the plates were washed with PBS-T (3 × 5 min) and incubated with serum from immunized mice (1:20 in blocking buffer) at 37 °C for 2 h. Detection was performed as described above.

For *Western blot*, 2 µg of each recombinant protein was subjected to SDS-PAGE 12%. Subsequently, these proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare™), blocked in blocking buffer at 4 °C for 2 h. After being washed in PBS-T (3 × 5 min each) it was incubated at room temperature for 3 h, with the pool of serum from each vaccinated group (1:100 in blocking buffer). After washing with PBS-T (3 × 5 min each), the anti-mouse IgG serum conjugated with peroxidase (diluted 1:6000 in blocking buffer) was added and incubated at

room temperature for 1 h. Bands of immunoreactive proteins were detected with DAB, 50 mM Tris-HCl and 0.3% Ni-SO₄.

2.8 Assessment of cellular immune response generated by DNA vaccines and recombinant subunit

2.8.1 Splenocyte culture

The cellular immune response was measured by performing splenocyte cultures from the spleen of immunized animals. For this, spleens of mice were macerated individually with sterile syringe plunger in sterile petry dishes containing a fine display of aluminum in the background. A volume of 10 ml of Hanks medium was added to aid maceration. This material was centrifuged for 10 min at 2500 × g, the supernatant discarded and cell lysis solution (ammonium acetate-Tris pH 7.2) added to the pellet. After 2-3 min, a centrifugation was performed for 10 min at 2500 × g, the supernatant discarded and the cells washed with Hanks medium supplemented with EDTA. After centrifuging 5 min at 2500 × g the supernatant was discarded and the pellet resuspended in complete medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were then grown in 24 wells polystyrene plates and incubated at 37 °C and 5% CO₂. The processed spleen from each animal was divided into four wells. After 24 h, each of them was stimulated with: 1 - recombinant protein (8 µg/well), 2 - *M. hyopneumoniae* 7448 extract (8 µg/well), 3 - Concanavalin A (8 µg/well) 4 - without stimulus. After 72 h, culture supernatant was collected and stored at -20 °C and the pellet stored at -80 °C in Trizol Reagent® (Invitrogen).

2.8.2 RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from splenocytes culture was extracted with Trizol Reagent® according to the manufacturer protocol (Invitrogen) and cDNA was synthesized as described in item 2.5.

2.8.3 Real time PCR

Primers for cytokine genes were synthesized according to Barnes et al. (2004), previously validated in real time PCR and used to study cytokine

expression. The PCR conditions used were as follow: final volume of 20 μ l containing 10 ng of cDNA, 3.5 mM MgCl₂, 3.1 pmol of each primer, 10 μ l Platinum Sybr green UDG (Invitrogen). The amplification was standardized in a 7500 Fast thermocycler (Applied Biosystems) using the following conditions: 50 °C for 20 s, 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. Melt curve conditions: 15 sec at 95 °C, 60 s at 60 °C, 30 sec at 95 °C and 15 s at 60 °C. The PCR product was subjected to electrophoresis on 1% agarosis gel for verification of unspecific bands. The gene for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as endogenous control. Graph of relative expression was generated according to Pfaffl (2001).

2.9 Statiscal analysis

Statical differences from ELISA assays were determined by using analysis of variance (ANOVA) with Tukey teste in the software SAS 9.1 (2004). A *P* value of 0.05 or 0.01 was considered significant.

3 Results

3.1 Cloning of selected targets

The four selected targets were successfully amplified by PCR and cloned in pcDNA3 and pAE or pET200D TOPO vectors. The methodology adopted to carry out site-directed mutagenesis was efficient since MHP0246 (P37) and MHP0513 (P46) had the TGA replaced by TGG codon, a result confirmed by sequencing. Figure 1 shows the PCR results of one mutated target.

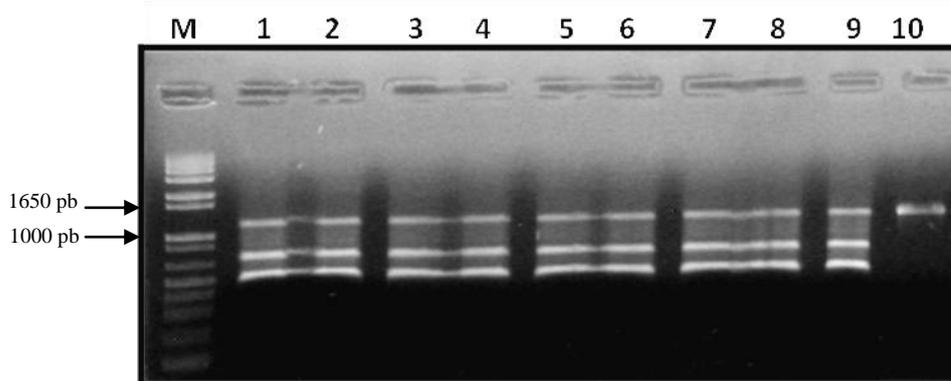


Figure 1. Electrophoresis in 1% agarose gel stained with gel red of MHP00513 (P46) site-directed mutation fragments. M- 1 kb plus molecular weight marker; lines 2-9 - gene products obtained from the second round of PCR, where the gene products of the first stage PCR were attached to the extension of the entire fragment, line 10 - PCR product obtained from amplification using *M. hyopneumoniae* genomic DNA and external primers, used as positive control.

The pCDNA3/P37, pCDNA3/P42, pCDNA3/P46 and pCDNA3/P95 constructs were confirmed enzymatically and showed high purity ($A_{260} > 1.8$ and < 2.2) and enough concentrations for use as DNA vaccines in the subsequent experiments. The yield of purified plasmid DNA was from 500 to 2500 $\mu\text{g/L}$ of culture (Figure 2).

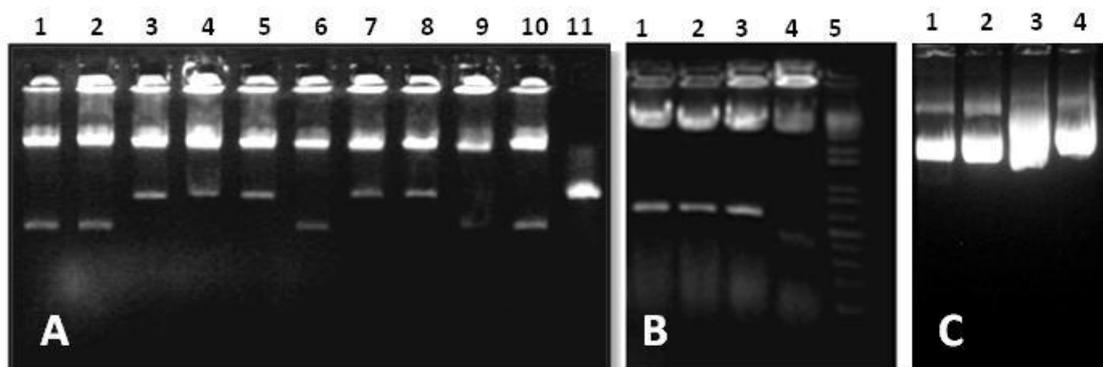


Figure 2. **A-** Electrophoresis in 1% agarose gel showing the screening of pcDNA3/P95 recombinant clones. 1, 2, 6, 9, 10 - non-recombinant clones; 3, 4, 5, 7 and 8 - recombinant clones; 11 - Confirmed pcDNA3/P95 recombinant clone purified. **B-** Enzymatic characterization of pcDNA3/P37 clones. **C-** Purified DNA used for vaccination: 1 - pcDNA3/P37; 2 - pcDNA3/P42; 3 - pcDNA3/P46; 4 - pcDNA3/P95.

3.2 Expression and purification of recombinant proteins

The recombinant proteins P37, P42, P46 and P95 were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) RIL Condon Plus and purified by affinity chromatography according to Simionatto et al. (2009) (Figure 3). All purified proteins were insoluble in the pellet of bacterial cell lysates, thus the proteins in inclusion bodies were solubilized in a buffer containing 8M urea. The purification strategy used allowed to obtain enough purity and amount for further studies. The yield of recombinant proteins P37, P42, P46 and P95 was

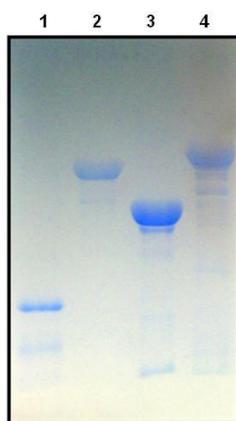


Figure 3. Electrophoresis in 12% SDS-PAGE of the four recombinant proteins purified by affinity chromatography. Line 1, P37 (20 kDa); Line 2, P42 (42 kDa); Line 3, P46 (35 kDa); Line 4, P95 (41 kDa).

3.3 *In vitro* transfection of Vero cells

To investigate and ensure that pcDNA3/P37, pcDNA3/P42, pcDNA3/P46 and pcDNA3/P95 vectors can indeed transcribed the respective inserted coding sequence in mammalian cells, the presence of specific mRNA of these genes was verified by RT-PCR using total RNA isolated from Vero cells transfected with the recombinant vectors. As shown in Figure 4A, an amplified product with approximately 1065 bp was observed in cells transfected with pcDNA3/P95, confirming transcription of the gene in mammalian cells. The mRNA of other genes, on the other hand, was not observed with this technique. When evaluated by immunofluorescence (Figure 4B), only the P37 protein was recognized by polyclonal antibodies, indicating that it was expressed *in vitro*.

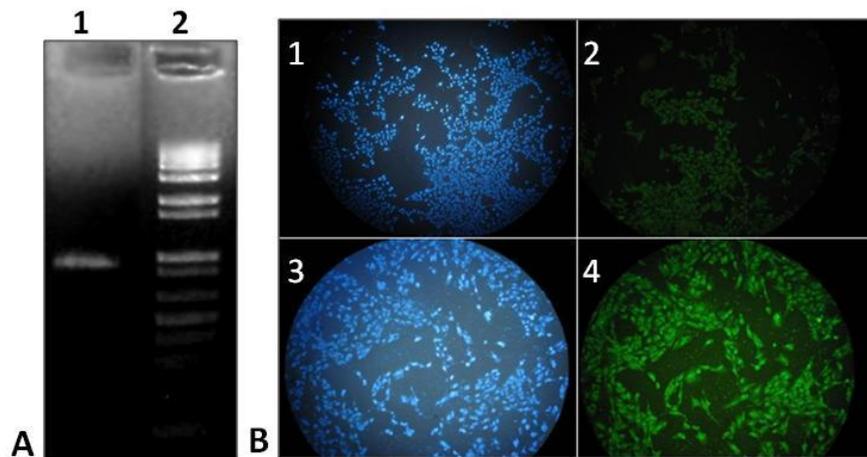


Figure 4. **A)** Electrophoresis in 1% agarosis gel showing: Line 1, RT-PCR amplification of P95 after Vero cells transfection with pcDNA3/P95 vector; Line 2, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). **B)** Immunofluorescence of Vero cells transfected with: Line 1, non-recombinant pcDNA3 (negative control), stained with Hoestch; Line 2, non-recombinant pcDNA3 (negative control), stained with Fitz (negative reaction); Line 3, pcDNA3/P37 stained with Hoestch; Line 4, pcDNA3/P37 stained with Fitz (positive reaction).

3.4 Immunogenicity of recombinant subunit and DNA vaccines

At 42 days post immunization (DPI), sera of animals immunized with recombinant vaccines showed specific antibodies against P37, P42, P46 and P95 proteins. This response was constant until 84 DPI. The antibodies in serum of animals inoculated with saline and the commercial vaccine did not recognized P37, P42, P46 and P95 recombinant proteins. Among the recombinant subunit vaccines tested, P42 and P95 proteins showed the highest ($P < 0.01$) seroconversion at 84 days post immunization (Figure 5). Among DNA vaccines, only pcDNA3/P46 vaccine showed seroconversion, which was statistically ($p < 0.01$, according to Tukey test) equal to P95, and superior to P46 recombinant subunit vaccines. Although P42 and P95 vaccines showed a mixed IgG1 and IgG2a immune response, there was a predominance of humoral immune response (IgG1) against cellular response (IgG2a), even in animals immunized with DNA vaccine (pcDNA3/P46). The P42 vaccine showed the highest IgG1 and IgG2a levels, followed by P95 and pcDNA3/P46 vaccines (Figure 6).

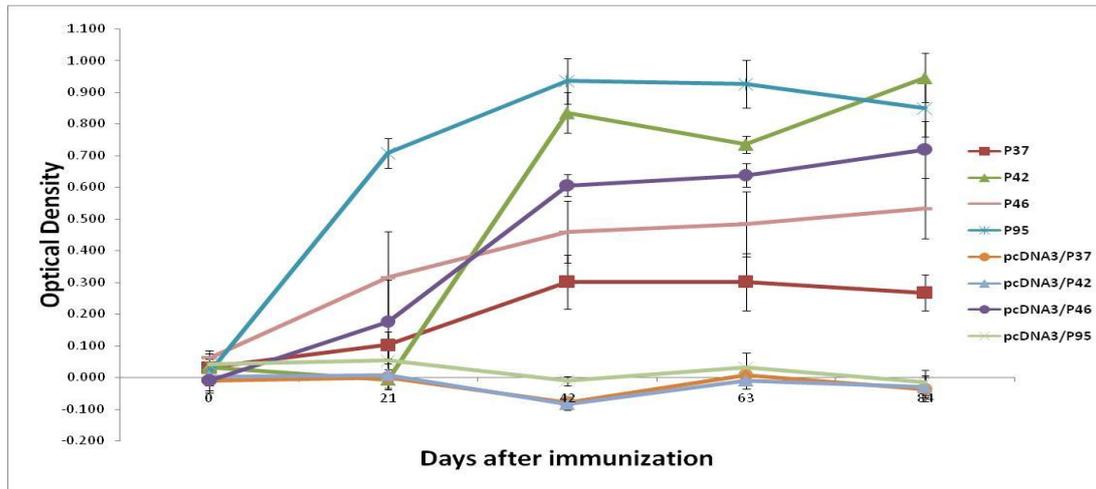


Figure 5. Optical density (mean +/- SD) obtained by indirect ELISA, using serum (diluted 1:50) of individual mice immunized with vaccines P37, P42, P46, P95, pcDNA3/P37, pcDNA3/P42, pcDNA3/P46 and pcDNA3/P95,. Serum was collected on days 0, 21, 42, 63 and 84 DPI. Anti-mice IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:4000) was used as secondary antibody. The colorimetric reaction was generated by adding 0-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) and hydrogen peroxide, and stopped with 2M H₂SO₄. The optical density (492 nm) of subunit and DNA vaccines was subtracted from the optical density generated by the negative control (saline and pcDNA3, respectively).

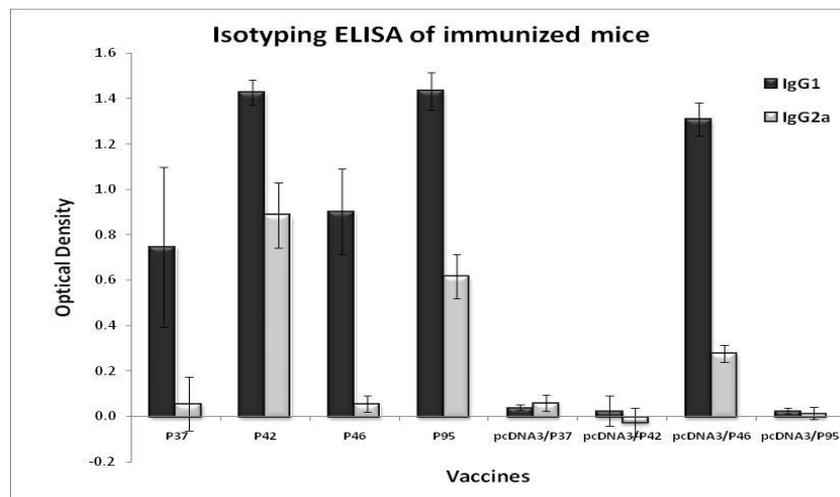


Figure 6. Optical density (mean +/- SD) obtained by sandwich ELISA using individual sera (100 µg each well) of animals immunized with vaccines P37, P42, P46, P95, pcDNA3/P37, pcDNA3/P42, pcDNA3/P46 and pcDNA3/P95, 84 DPI. Anti-mice IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:4000) was used as secondary antibody. The colorimetric reaction was generated by adding 0-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) and hydrogen peroxide, and stopped with 2M H₂SO₄. The optical density (492 nm) of recombinant subunit and DNA vaccines was subtracted from the optical density generated by the negative control (saline and pcDNA3, respectively) and from pre-immune sera (day 0).

To verify that antibodies produced by mice immunized with recombinant vaccines are able to recognize *M. hyopneumoniae* native protein, an ELISA was performed using cell lysates of this strain 7448 as antigen. In this test, serum of mice immunized with recombinant vaccines P42, P46, P95 and pcDNA3/P46 significantly recognized native proteins 84 DPI (Figure 7). In *Western blot* analysis, the same result was observed, except for P46 vaccine, whose serum did not react with the native protein (Figure 8).

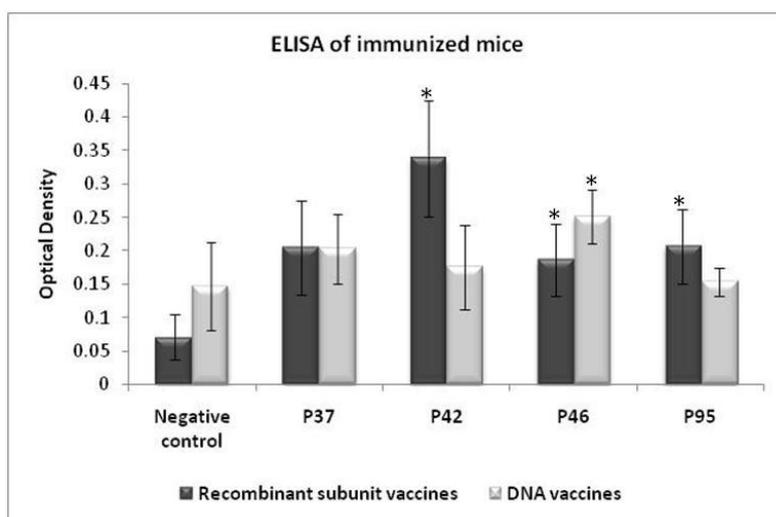


Figure 7. Indirect ELISA analysis of native proteins of *M. hyopneumoniae* strain 7448 (1 µg each well), using individual serum (diluted 1:20) from mice immunized with recombinant vaccines (P37, P42, P46, P95, pcDNA3/P37, pcDNA3/P42, pcDNA3/P46, pcDNA3/P95) 84 DPI. Anti-mice IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:4000) was used as secondary antibody. The colorimetric reaction was generated by adding 0-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) and hydrogen peroxide, and stopped with 2M H₂SO₄. Data shows optical density (492 nm), previously subtracted from pre-immune serum (day 0). Treatments that differed from the negative control (saline for subunit vaccines and pcDNA3 for DNA vaccines) are marked with an asterisk.

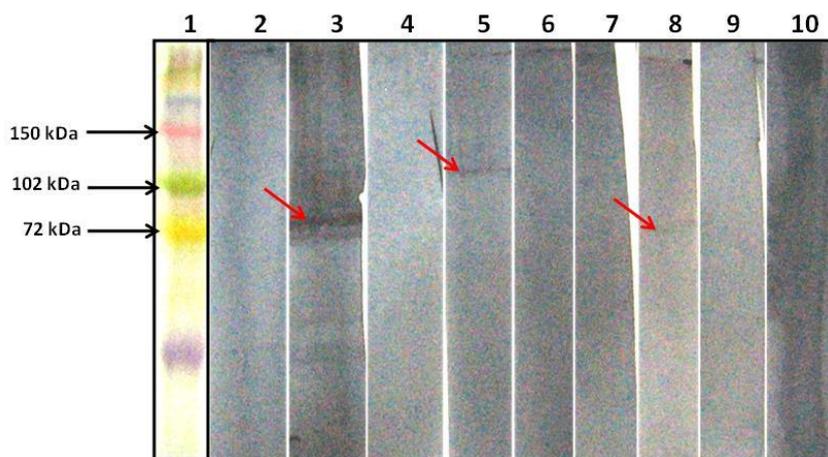


Figure 8. Western blot analysis of native proteins of *M. hyopneumoniae* strain 7448, probed with pool of mice sera (diluted 1:100) immunized with recombinant vaccines. Anti-mice IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:6000) was used as secondary antibody. Line 1, Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Ge Healthcare). Line 2, P37 (139.9 kDa); Line 3, P42 (65 kDa); Line 4, P46 (46 kDa); Line 5, P95 (132 kDa); Line 6, pcDNA3/P37; Line 7, pcDNA3/P42; Line 8, pcDNA3/P46; Line 9, pcDNA3/P95; Line 10, Salina. The immunoreactive bands are indicated with a red arrow.

3.5 Real time PCR

Primers for cytokines IL-1, TNF α and INF γ , as well as, the endogenous gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) showed efficiency closed to 100% when tested in serial dilutions of cDNA (101.23%, 93.9%, 81.5% and 97.4%), in different concentrations. Total RNA from splenocytes obtained from vaccinated groups was subjected to real time PCR analysis. Both recombinant subunit and DNA vaccines showed less or equal IL1 and TNF α expression to the control (saline group and pcDNA3 group, respectively). Bacterin vaccinated group (positive control) showed IL1 expression higher than the control (saline group) (Figure 9A and 9B). Only recombinant subunit vaccines induced more INF γ expression than the control (Figure 9C). All DNA vaccinated groups showed less IL1 and INF γ expression than recombinant subunit vaccines. However, these groups induced more expression of TNF α than recombinant subunit vaccinated groups, except for P37 vaccine. P46 vaccines (both vaccination strategies, DNA and subunit vaccines) showed impressive lower IL1 and TNF α expression levels. P37 vaccine, which had lower antibody level compared to other vaccines evaluated, showed the highest INF γ , IL1 and TNF α expression levels, although the last two were not higher than the control.

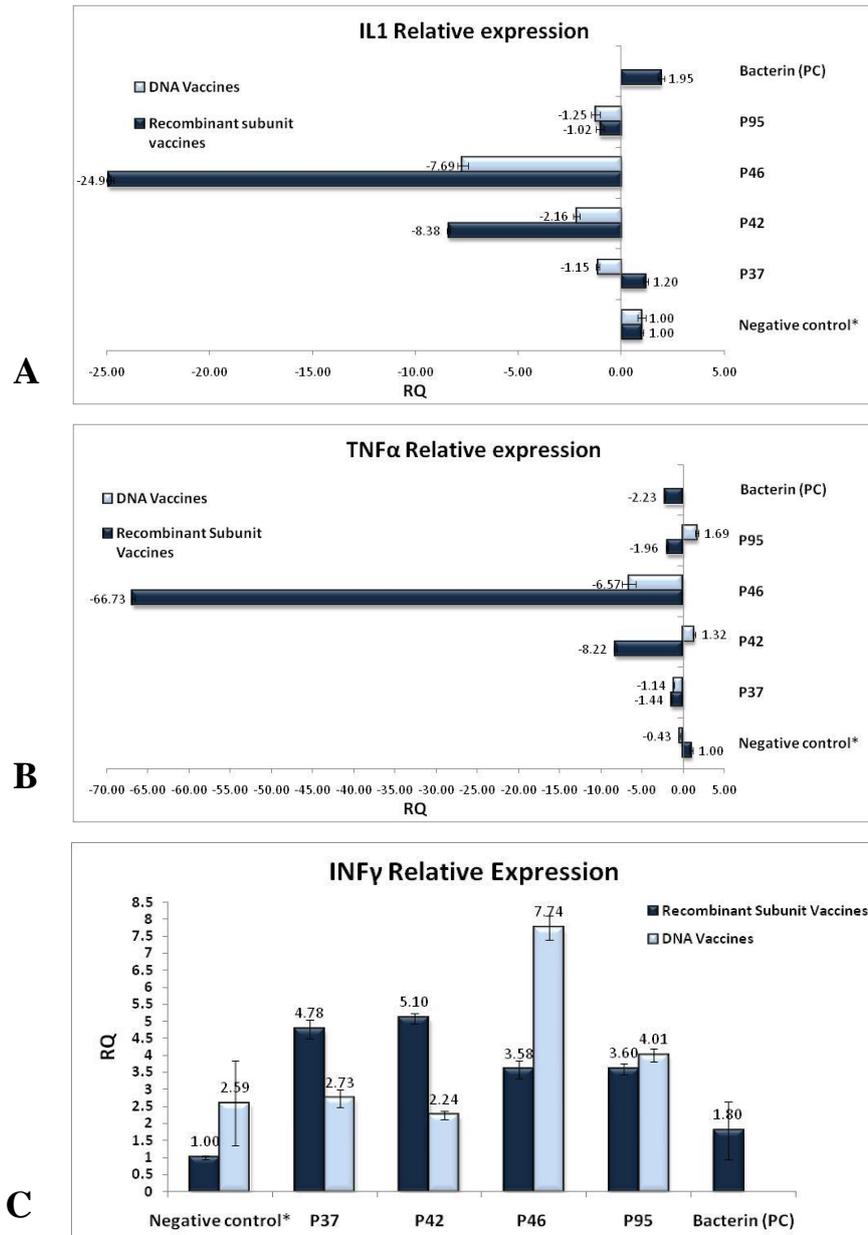


Figure 9. Relative expression levels of IL1 (A), TNF α (B) and INF γ (C) cytokines. Splensens from animals immunized with P37, P42, P46 and P95, delivered as recombinant subunit or DNA vaccines, were collected and splenocytes were cultured and stimulated with P37, P42, P46 or P95 recombinant proteins, respectively. Total RNA from these cultures was used on Real time PCR analysis. Data show expression levels relative to negative control (*saline group was used to compare recombinant subunit vaccine groups and pcDNA3 group was used to compare DNA vaccine groups). Data were normalized to GAPDH endogene gene.

4 Discussion

Although commercial vaccines are widely applied worldwide, they are not able to provide adequate protection and prevention of colonization, highlighting the

need for new vaccines with improved efficacy (THACKER et al., 1998, 2000). DNA vaccines that can be produced and delivered easily and cheaply are strongly encouraged (KUTZLER and WEINER, 2008). In this study, four immunogenic *M. hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 were evaluated in parallel as subunit and as DNA vaccine candidates.

Analysis of antibody responses in serum of mice vaccinated with both vaccine formulations revealed that all subunit vaccines were able to induce IgG specific antibody, but only pcDNA3/P46, among the DNA vaccines, induced humoral immune response, which was observed in both total IgG (Figure 5) and IgG isotyping (Figure 6) ELISAs. Although intramuscular protein vaccination generally elicits an antibody response whereas DNA vaccine induces cellular immunity, the humoral immune response of pcDNA3/P46 was even higher ($p < 0.01$) and more constant between animals than P46 delivered as recombinant subunit vaccine. This result is in accordance with a recent CHEN et al. (2008) study, where P46 also elicited a serum IgG response in mice intramuscular immunized with a DNA vaccine cocktail comprising antigens P36, P46, NrdF, and P97 or P97R1 (). However, they used the entire sequence of P46 while we omitted the first 300 nucleotides to avoid the need to mutate two more TGA codons. The omitted sequence was not necessary to elicit immune response in both vaccine formulations. Furthermore, as far as we know, the immune response elicited by this antigen alone had never been evaluated.

The antigen P42, delivered as a DNA vaccine had already been evaluated in mice and shown to be able to elicit high antibody levels (CHEN et al., 2003). However, they used the entire P42 coding sequence while we used only the C terminal portion, as we had already shown that this part is enough to induce humoral immune response when delivered as subunit vaccine (SIMIONATTO, 2008). Although the pcDNA3/P42 construct has its sequence confirmed by DNA sequencing, transcription from pcDNA3/P42 was not observed in transfected mammalian Vero cells. Thus, it seems that N terminal portion of this protein is necessary to generate transcription in mammalian cells and induction of immune response when used as DNA vaccine, or play a role in the protein stability.

It is not clear why other DNA vaccine constructs failed to elicit serum IgG response. P37 protein was recognized by polyclonal antibodies in

immunofluorescence assay and P95 mRNA was detected by RT-PCR in transfected Vero cells, indicating that they were expressed. One possible explanation could be that the *in vivo* expression of these proteins was poor and the antibodies induced by them were not measurable compared to that of P46. Furthermore, similar to P42, P46 and P95 subunit vaccines, pcDNA3/P46 also induced antibodies able to recognize native proteins, as observed in ELISA and *Western blot* analysis (Figure 7 and 8, respectively). It means that the folding acquired by these proteins was probably similar to the native ones, exposing epitopes in the surface of the protein. Thus, correct folding and/or other posttranslational modifications may have contributed to pcDNA3/P46 generate antibodies while other antigens delivered as DNA vaccine could not.

DNA vaccination has been demonstrated to induce both humoral and cellular immune responses (BABIUK, 2002). The immune system modulation, Th type and IgG subclass distribution perhaps are important for protection against enzootic pneumonia. Th1 cells can activate macrophages to destroy intracellular microorganisms more efficiently and also activate B cells to produce strongly opsonizing antibodies such as IgG2a and IgG2b in mice. On the other hand, Th2 cells induce B cells to proliferate and produce antibodies such as IgG1 and other types (JANEWAY et al., 2007). Therefore, we assayed IgG subclasses, IgG1 and IgG2a, and INF γ cytokine produced by mice immunized with the recombinant vaccines (P37, P42, P46 and P95) evaluated on this study. Protein vaccines are generally known to produce predominately Th2 responses with little or no Th1 responses. Surprisingly, all subunit recombinant vaccines elicited higher INF γ levels than negative control (Figure 9); P42 and P95 vaccines also elicited higher IgG2a than the other vaccines. Chen et al. (2008) showed the same behavior in splenocytes from mice immunized with a protein cocktail vaccine. There was no report in the literature about cell immunity induction by P42 or P95 delivered as subunit vaccines. The protein nature could be responsible for immune system modulation since heat shock proteins, such as P42, have been shown to recognize multiple B-cell and T-cell (CHEN et al., 2003) and have also been used as an adjuvant to enhance cell-mediated immune responses in DNA vaccines (CHEN et al., 2000). However, it is important to consider that the proteins evaluated on this study are in a recombinant form, which could modify the folding

from the native protein. Moreover, lipoproteins are known to induce proinflammatory cytokines (HERBELIN et al., 1994; BRENNER et al., 1997), which was not observed using the lipoprotein P95.

Interestingly, P46 as DNA vaccine generated more IgG1 and IgG2a antibodies, and also induced more INF γ gene expression than as subunit vaccine. In the same way, P42 and P95 subunit vaccines induced a mixed Th1/Th2-type immune response in mice, similar to what was observed when P42 was delivered as DNA vaccine (CHEN et al., 2003). Thus, both vaccination strategies seem promising using P42 antigen. It may be possible that the type of immune responses induced depends on the nature of antigen itself but also may be influenced by the vaccine candidate construct, adjuvant and the route of immunization. Conceição et al. (2006) reported that mice immunized with a recombinant subunit vaccine containing P97R1 fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *E. coli* induced Th1-biased immune responses when given intranasally, but not intramuscularly (which was Th2-biased). Chen et al. (2006) showed that *Salmonella typhimurium aroA* CS332 harboring an eukaryotic or prokaryotic expression vector encoding P97R1 or NrdF induced antigen-specific Th1-biased immune responses in mice immunized orally. A replication-defective recombinant adenoviruses (rAds) expressing the C-terminal portion of *M. hyopneumoniae* P97 adhesin also elicited both systemic immune responses to the encoded antigen in mice intranasally or intramuscularly immunized (OKAMBA et al., 2007). Mycobacterial ESAT-6 protein was able to enhance mouse IFN- γ response to *Mycoplasma hyopneumoniae* P71 protein (MENON et al., 2002) and P71 DNA vaccine (MINION et al., 2003). Therefore, it would be interesting to evaluate the improvement of Th2 immune response of pcDNA3/P46 using other routes of vaccination.

Proinflammatory cytokines are believed to play an important role in porcine respiratory disease by coordinating and activating the adaptive immune response, which enables the host to eliminate offending pathogens. However, significant tissue damage can occur if their levels become excessive (MAES et al., 2008). Some studies have shown an increase of tumor necrosis factor and interleukin 1 on bronchoalveolar lavage fluids (BALF) of pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, which showed intense lymphoid hyperplasia (LORENZO et al.,

2006; THANAWONGNUWECH et al., 2001). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs also showed that tumor necrosis factor- α concentration in BALF was increased in nonvaccinated challenged pigs, compared with vaccinated challenged pigs (THACKER et al., 2000). The presence of IL1 and TNF α in BALF would thus appear to be associated with the development of pneumonic lesions in *M. hyopneumoniae* infected pigs (MAES et al., 2008). In the present study, all vaccines evaluated reduced or maintained the expression of these cytokines, compared to negative control, especially P42 subunit vaccine and P46 antigen delivered as subunit or DNA vaccine (Figure 9).

It is also important to note that the commercial vaccine (Resp[®]Sure, Pfizer) did not induced antibodies in mice able to recognize any recombinant proteins used in this study and neither induced INF γ gene expression. The same result was observed by Simionatto (2008) using a wide range of recombinant proteins. Since commercial bacterins against PEP only alleviate lesions and the severity of the disease (THACKER et al., 1998, 2000), maybe a strongness effect could be acquired by the addition of immunogenic proteins such as those evaluated in this study.

In summary, we have shown that intramuscular immunization with pcDNA3/P46 vaccine delivered alone was able to induce both Th1 and Th2-biased immune response, with increase in INF γ levels but decrease in IL1 and TNF α levels, which are responsible for pig lesion during *M. hyopneumoniae* infection. This represented both a cellular and humoral immune response and therefore suggests its potential as a vaccine candidate. Also, P42 and P95, antigens that had never been evaluated regarding induction of cellular immune response, elicited high IgG2a and INF γ levels when delivered as subunit vaccines. However, it is well known that immune responses of mice may not always be extrapolated to other species, therefore, further studies in pigs are required to evaluate the use of these vaccines to control enzootic pneumonia.

- ADAMS, C.; PITZER, J.; MINION, F. C. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.73, p.7784-7787, 2005.
- BABIUK, L. A. Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. **The Veterinary Journal**, v.164, p.188-201, 2002.
- BLANCHARD, B.; VENA, M.M.; CAVALIER, A.; LE LANNIC, J.; GOURANTON, J.; KOBISCH, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.329–341, 1992.
- BRENNER, C.; WROBLEWSKI, H.; LE HENAFF, M.; MONTAGNIER, L.; BLANCHARD, A. Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces t-cell-independent b-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. **Infection and Immunity**, v.65, n.10, p.104322-4329, 1997.
- CHEN, C. H.; WANG, T. L.; HUNG, C. F.; YANG, Y.; YOUNG, R. A.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C.. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. **Cancer Research**, v.60, P.1035–1042, 2000.
- CHEN, J. R.; LIAO, C. W.; MAO, C. N. W. A recombinant chimere composed of repeat region rR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: *in vivo* evaluation of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, v.80, P.347-357, 2001.
- 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. R.; FORBES-FAULKNER, J.; DAGGARD, G. E.; MUKKUR, T. K. S.. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.252–259, 2006.
- CHEN, A.Y.; FRY, S.R.; DAGGARD, G.E.; MUKKUR, T.K. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma*

hyopneumoniae delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. **Vaccine**, v.26, p.4372-4378, 2008.

CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R.; DE LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, p.434-438, 1988.

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

DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; GUPTA, P. K.; RAI, R. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. **Veterinary Research Communication**, v.32, p.341-356, 2008.

DYBVIK, K.; VOELKER, L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.25-57, 1996.

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

HERBELIN, A.; RUUTH, E.; DELORME, D.; MICHEL-HERBELIN, C.; PRAZ, F. *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4690-4694, 1994.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença**. 6° Edição, Artmed, Porto Alegre, 848p, 2007.

JOHANSSON, E.; WALLGREN, P.; FUXLER, L.; DOMEIKA, K.; LEFÈVRE, F.; FOSSUM, C. The DNA vaccine vector pcDNA3 induces IFN- α production in pigs. **Veterinary Immunopathology**, v.87, i.1-2, p.29-40, 2002.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-rapid and inexpensive

- plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**. H.71, p.234, 2002.
- KUTZLER, M.; WEINER, D. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature**, v.9, p.776-788, 2008.
- LIN, J.; WENG, C. N.; LIAO, C. W.; YEH, K. S.; PAN M. J. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.69–74, 2003.
- LIU, M. A.; WAHREN, B.; GUNILLA, B.; HEDESTAM, K. DNA vaccines: recent developments and future possibilities. **Human Gene Therapy**, v.17, n.11, p.1051-1061, 2006.
- LORENZO, H.; QUESADAA, O.; ASSUNÇÃO, P.; CASTROA, A.; RODRÍGUEZ, F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, i.3-4, p.199-207, 2006.
- MAES, D.; SEGALLES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 297–309, 2008.
- MEENS, J.; SELKE, M.; GERLACH, G-F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins mhp378 and mhp651. **Veterinary Microbiology**, v.116, P.85–95, 2006.
- MENON, S.; WANNEMUEHLER, M.; MAHAIRAS, G.; MINION, F. MYCOBACTERIAL ESAT-6 protein enhances mouse INF- γ responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* p71 protein. **Journal of interferon & cytokine research**, v.22, n.7, p.807-813, 2002.
- MINION, F.; MENON, S.; MAHAIRAS, G.; WANNEMUEHLER, M. Enhanced murine antigen-specific gamma interferon and immunoglobulin G2a responses by using mycobacterial ESAT-6 sequences in DNA vaccines. **Infection and Immunity**, v.71, n.4, p.2239-2243, 2003.
- MORI, Y.; HAMAOKA, T.; SATO, S.; TAKEUCHI, S. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.19, p.239–250, 1988.

- MURPHY, D.; VAN ALSTINE, W.; CLARK, K.; ALBREGTS, S.; KNOX, K. Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.1874–1880, 1993.
- OKAMBA, F.; MOREAU, E.; CHEIKH SAAD BOUH, K.; GAGNON, C. A.; MASSIE, B.; ARELLA, M. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 adhesin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.767–774, 2007.
- OKAMBA, F. R.; ARELLA, M.; MUSIC, N.; JIA, J. J.; GOTTSCHALK, M.; GAGNON, C. A. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine**, v.28, p.4802–4809, 2010.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, i.9, p.45, 2001.
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.62, p.1094-1156, 1998.
- RODRIGUEZ, F.; RAMIREZ, G. A.; SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; LORENZO, H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p.306–312, 2004.
- ROSS, R.F., LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLL, E. Diseases of swine. **Mycoplasma Disease**, The Iowa State University Press, Ames, IA. p. 469–483, 1986.
- SIMIONATTO, S. **Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação**. 2008. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.
- SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S.; GALLI, V.; LUERCE, T.; HARTWIG, D.; MOREIRA, A.; DELLAGOSTIN, O. Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v.79, i.1, p.101-105, 2009.

SIMIONATOO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI V.; HARTWIG, D. D.; CARLESSI, R. M.; MUNARI, F. M.; LAURINO, J. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.69, i.1, p.132-137, 2010.

SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **The Veterinary Journal**, v.170, p.289–299, 2005.

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

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

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). SAS user's guide: Statistics. SAS Institute, Cary, NC, 2004.

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

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

THACKER, E.; THACKER, B.; BOETTCHER, T.; JAYAPPA, H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Swine Health and Production**, v.6, n.3. p.107–112, 2008.

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

ULMER, J. B., VALLEY, U., RAPPUOLI, R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 11, 2006.

VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V. ; BONATTO, S.L.; CARVALHO, M.O.; PINTO, P.M.; ALMEIDA, D.F.; ALMEIDA, L.G.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E.N.; AZEVEDO, V.A.; BOGO, M.R.; BRIGIDO, M.M.; BROCCHI, M.; BURITY, H.A.; CAMARGO, A.A.. CAMARGO, S.S.; CAREPO, M.S.; CARRARO, D.M.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.; LOPES, M.I.; LORETO, E.L.; MADEIRA, H.M.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.; MOREIRA, M.A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.E.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5568–5577, 2005.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo caracterizamos a antigenicidade e imunogenicidade, em camundongos, de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*, administradas isoladamente ou em formulações contendo associação de proteínas. As proteínas recombinantes MHP0107, MHP0272, MHP0418, MHP0372, MHP0660, MHP0443 e MHP0487 foram reconhecidas pelo soro de animais convalescentes, indicando serem expressas durante o processo infeccioso. Estas proteínas recombinantes, bem como P37, P42, P46 e P95 apresentaram capacidade imunogênica, induzindo ambas as respostas imune Th1 e Th2. As proteínas P37, P42, P46 e P95, e a vacina de DNA pcDNA3/P46 também foram capazes de induzir a expressão de INF γ , citocina associada a resposta imune celular e reduzir a expressão de TNF α e IL1, relacionadas com as lesões em suínos, durante infecção por *M. hyopneumoniae*, sugerindo o potencial destas como candidatas vacinais. A estratégia de imunização utilizando combinação de proteínas potencializou a resposta imune, sugerindo que esta estratégia poderia resultar na geração de respostas imunológicas distintas, envolvendo imunidade humoral, celular e regulatória. Além disso, MHP0107, MHP0418 e MHP0372 induziram anticorpos que reagiram especificamente contra proteínas das cepas 7448, 4722 e J de *M. hyopneumoniae*, não apresentando reação cruzada com *M. hyohinis* e *M. flocculare*, podendo ser utilizadas em ensaios de imunodiagnóstico. Este estudo, portanto, contribuiu para a identificação de antígenos candidatos para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos e de uma nova vacina contra a Pneumonia Enzoótica Suína, além de avaliar diferentes formulações e estratégias vacinais.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, C.; PITZER, J.; MINION, F. C. *In Vivo* Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.73, p.7784-7787, 2005.

ADERKA, D.; Le, J.M.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide- induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells and in mice. **Journal of Immunology**, v.143, p.3517–3523, 1989.

ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology, **Vaccine**, v.21. p.605– 610, 2003.

AMERI-MAHABADI, M.; ZHOU, E.M.; HSU, W.H. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.61–64, 2005.

AMERI, M.; ZHOU, E.M.; HSU, W. H. *Western blot* immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti- *Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.198–201, 2006.

ASSUNÇÃO, P.; RAMIRES, A.; FE, C.; LLAMAZARES, O.; POVEDA, J. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. **Veterinary Research Communications**, v.29, p.563–574, 2005.

ASSUNÇÃO, P.; ROSALES, R. S.; ANTUNES, N. T.; FE, C.; POVEDA, J. B. Applications of flow cytometry to mycoplasmology. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.664-672, 2007.

BANDRICK, M.; PIETERS, M.; PIJOAN, C.; MOLITOR, T. Passive Transfer of Maternal *Mycoplasma hyopneumoniae* -Specific Cellular Immunity to Piglets. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n.3, p.540-543, 2008.

BARGEN, L. E. A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p.856-859, 2004.

BAUTSCH W.: Rapid physical mapping of the *Mycoplasma mobile* genome by two-dimensional field inversion gel electrophoresis techniques. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.11461-11467, 1988.

BLANCHARD, B; VENA, M.M.; CAVALIER, A.; LE LANNIC, J.; GOURANTON, J.; KOBISCH, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.329–341, 1992.

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

CAI, H.Y.; DREUMEL, T.V.; MCEWEN, B.; HORNBY, G.; BELL-ROGERS, P.; MCRAILD, P.; JOSEPHSON G.; MAXIE, G. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.91–95, 2007.

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

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

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

CASTRO, L. A.; PEDROSO, T. R.; KUCHIISHI, S. S.; RAMENZONI, M.; KICH, J. D.; ZAHA, A.; VAINSTEINA, M. H.; FERREIRA, H. B. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Veterinary Microbiology**, v.116, i.4, n.10, p.258-269, 2006.

CHAMBAUD, I., R.; FERRIS, H. S.; BARBE, V.; SAMSON, D.; GALISSON, F.; MOSZER, I.; DYBVIK, K.; WROBLEWSKI, H.; VIARI, A.; ROCHA, E. P.; BLANCHARD, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.2145–2153, 2001.

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

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

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. R.; FORBES-FAULKNER, J.; DAGGARD, G. E.; MUKKUR T. K. S.. Comparative immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* NrdF encoded

in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.252–259, 2006.

CHEN, A.Y.; FRY, S.R.; DAGGARD, G.E.; MUKKUR, T.K.. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. **Vaccine**, v.26, p.4372-4378, 2008.

CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R.; DE LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, p.434-438, 1988.

CLARK, L.; FREEMAN, M.; SCHEIDT, A.; KNOX, K. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. **Veterinary Medicine**, v.86, p.543–550, 1991.

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

DJORDJEVIC, S.; EAMENS, G.J.; ROMALIS, L.F.; NICHOLLS, P.J.; TAYLOR, V.; CHIN, J. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. **Australian Veterinary Journal**, v.75, p.504–511, 1997.

DJORDJEVIC, S. P.; CORDWELL, S. J.; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J.; MINION, F.C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesion. **Infection and Immunity**, v.72, p.2791– 2802, 2004.

DUBOSSON, C.R.; CONZELMANN, C.; MISEREZ, R.; BOERLIN, P.; FREY, J.; ZIMMERMANN, W.; HÄNI, H.; KUHNERT, P. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.102, p.55–65, 2004.

DYBVIK, K.; VOELKER, L.L. Molecular Biology of Mycoplasmas. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.25–57, 1996.

ERLANDSON, K.; EVANS, R.B.; THACKER, B.J.; WEGNER, M.W.; THACKER, E.L. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **The Journal of Swine Health and Production**, v.13, p.198– 203, 2005.

FADIEL, A.; EICHENBAUM, K. D.; SEMARY, N. E.; EPPERSON, B. Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.2020-2028, 2007.

FAGAN, P. K.; DJORDJEVIC, S. P.; EAMENS, G. J.; CHIN, J.; WALKER, M. J. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (*nrdF*) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. **Infection and Immunity**, v.64, p.1060–1064, 1996.

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

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

FENG, Z.; SHAO, G.; LIU, M.; WANG, H.; GAN, Y.; WU, X. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Microbiology**, v.143, p.410–416, 2010.

FREUNDT, E. A.; WHITCOMB, R. F.; BARILE, M. F. Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1979.

FRIIS, N.F. *M. suis* pneumoniae and *M. flocculare* in comparative pathogenicity studies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.15, p.507–518. 1974.

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

GIBSON, D. G.; GLASS, J. I.; LARTIGUE, C.; NOSKOV, V. N.; CHUANG, R. Y.; ALGIRE, M. A.; BENDERS, G. A.; MONTAGUE, M. G.; MA, L.; MOODIE, M. M., et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. **Science**, v.329, p.52-56, 2010.

GLASS, J. I.; LEFKOWITZ, E. J.; GLASS, J. S.; HEINER, C. R.; CHEN, E. Y.; CASSELL, G. H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. **Nature**, v.407, p.757–762, 2000.

HALDIMANN, A., NICOLET, J. and FREY, J. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.317–323, 1993.

HANNAN, P. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species. **Veterinary Research**, v.31, p. 373-395, 2000.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H. PIRKL, E.; LI, B. C.; HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.4420–4449, 1996.

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

HUTCHISON, C. A.; PETERSON, S. N.; GILL, S.R.; CLINE, R. T.; WHITE, O.;FRASER, C. M; SMITH, H. O.; VENTER, J. C. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. **Science**, v.286, p.2165–2169, 1999.

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

INAMOTO, T., TAKAHASHI, H., YAMAMOTO, K., NAKAI, Y., OGIMOTO, K. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v.56, p.393–394, 1994.

JAFFE, J. D.; STANGE-THOMANN, N.; SMITH, C.; DECAPRIO, D.; FISHER, S.; BUTLER, J.; CALVO, S.; ELKINS, T.; FITZGERALD, M. G; HAFEZ, N.; KODIRA, C. D.; MAJOR, J.; WANG, S.; WILKINSON, J.; NICOL, R.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B.; BERG, H. C.; CHURCH, G. M. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Research**, v.14, p.1447–1461, 2004.

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

JENKINS, C.; WILTON, J.; MINION, C.; FALCONER, L.; WALKER, M.; DJORDJEVIC, S. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. **Infection and Immunity**, v.74, n.1, p.481-487, 2006.

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

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

KING, K.; FAULDS, D.H.; ROSEY, E.L.; YANCEY, R.J. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. **Vaccine**, v.15, p.25- 35, 1996.

KOKOTOVIC, B., FRIIS, N.F., JENSEN, J.S., AHRENS, P. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3300–3307, 1999.

KOONIN, E. V.; TATUSOV, R. L.; RUDD, K. E: Protein sequence comparison at genome scale. **Methods Enzymology**, v.266, p.295-322, 1996.

KWON, D. ; CHAE, C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lung from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. **Veterinary Pathology**, v.36, p.308-313, 1999.

KURTH, K.; HSU, T.; SNOOK, E. R.; THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; MINION, F. C. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.463–469, 2002.

LADEFOGED, S. A.; CHRISTIANSEN, G.: Physical and genetic mapping of the genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.2199-2207, 1992.

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

LIN, J.; WENG, C. N.; LIAO, C. W.; YEH, K. S.; PAN M. J. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.69–74, 2003.

LIVINGSTON, D.W., STAIR, E.L., UNDERDAHL, N.R., MEBUS, C.A. Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, p.2249–2258, 1972.

MADSEN, M.L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E.L.; CARRUTHERS, M.D.; MINION, F.C. Transcriptome Changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during Infection. **Infection and immunity**, p. 658–663, 2008.

MAES, D.; MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **Veterinary Quarterly**, v.18, p.104-109, 1996.

MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS, B.; VERBEKE, W.; VIAENE, J.; DE KRUIF, A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. **Vaccine**, v.17, p.1024–1034, 1999.

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

MAROIS, C.; CARROU, J. L.; KOBISCHA, M.; GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.96–104, 2007.

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

MAYOR, D.; JORES, J.; KORCZAK, B. M.; KUHNERT, P. Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: A diverse pathogen with limited clonality. **Veterinary Microbiology**, v.127, i.1-2, n.5, p.63-72, 2008.

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

MEENS, J.; BOLOTIN, V.; FRANK, R.; BÖHMER, J.; GERLACH, G. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. **Veterinary Microbiology**, v.142, i.3-4, n.19, p.293-302, 2010.

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

MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M.; MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.7123–7133, 2004.

MOORKAMP, L.; BEILAGE, E.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in piglets. **Tierärztliche Praxis Großtiere**. v.6, 2010.

MUNETTA, Y.; MINAGAWA, Y.; SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; HIKONO, H.; MORI, Y. Immune Response of Gnotobiotic Piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.70, n.10, p. 1065–1070, 2008.

MURPHY, D.; VAN ALSTINE, W.; CLARK, K.; ALBREGTS, S.; KNOX, K. Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.1874–1880, 1993

OKADA, M.; ASAI, T.; FUTO, S.; MORI, Y.; MUKAI, T.; YAZAWA, S.; UTO, T.; SHIBATA, I.; SATO, S. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.251-259, 2005.

OKAMBA, F.; MOREAU, E.; CHEIKH SAAD BOUH, K.; GAGNON, C. A.; MASSIE, B.; ARELLA, M. Immune responses induced by replication-defective adenovirus

expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae* -P97 adhesin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.767–774, 2007.

OKAMBA, F. R.; ARELLA, M.; MUSIC, N.; JIA, J. J.; GOTTSCHALK, M.; GAGNON, C. A. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine**, v.28, p.4802–4809, 2010.

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

PAPAZISI, L.; GORTON, T. S.; KUTISH, G.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; NGUYEN, D. K.; SWARTZELL, S.; MADAN, A.; MAHAIRAS, G.; GEARY, S. J. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. **Microbiology**, v.149, p.2307–2316, 2003.

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

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

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

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

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62, p.1094-1156, 1998.

RAZIN, S. Molecular biology and genomics of Mollicutes. **Bulletin of Insectology**, v.60, n.2, p.101-103, 2007.

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

RODRIGUEZ, F.; QUESADA, O.; POVEDA, J. B.; FERNANDEZ, A.; LORENZO, H. Immunohistochemical detection of Interleukin-12 and Interferon- γ in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.136, p.79-82, 2007.

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

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

SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; RAMIREZ, A. S.; FERNANDEZ, A.; GO MEZ-VILLAMANDOS, J. C.; JOVER, A.; LORENZO, H.; HERRA´EZ, P.; RODRI´GUEZ, F. A Morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet Pathology**, v.40, p.:395–404, 2003.

SASAKI, Y.; ISHIKAWA, J.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; KENRI, T.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; HORINO, A.; SHIBA, T.; SASAKI, T.; HATTORI, M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.5293–5300, 2002.

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

SIBILA, M; CALSAMIGLIA, M.; VIDAL, D.; BADIELLA, L.; ALDAZ, A.; JENSEN, J. C. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in twelve farms with different production systems. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.68, p.12–18, 2004.

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

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

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, i.3, p.221-231, 2009.

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

SIMIONATOO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI V.; HARTWIG, D. D.; CARLESSI, R. M.; MUNARI, F. M.; LAURINO, J. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae*

expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.79, i.1, p.101-105, 2009.

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

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

STAKENBORG, T.; VICCA, J.; MAES, D.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESBROUCK, F.; BUTAYE, P. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. **Journal Microbiology Methods**, v. 66, p.263–275, 2006.

STEENHARD, N. R.; JUNGENSEN, G.; KOKOTOVIC, B.; BESHAN, E.; DAWSON, H. D.; URBAN, J. F.; ROEPSTORFF, A.; THAMSBORG, S. M. *Ascaris suum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. **Vaccine**, v.27, p.5161–5169, 2009.

STRAIT, E. L.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; DAMMEN, M.; JONES, K. R.; THACKER, E. L. Real-time PCR assays to address genetic diversity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2491-2498, 2008.

STRAIT, E. L.; VICKI, D. V. M.; RAPP-GABRIELSON, J.; ERICKSON, B. Z.; EVANS, R. B.; TAYLOR, L. P.; YONKERS, T. K.; KEICH, R. L.; JOLIE, R.; THACKER, E.L. Efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin in pigs challenged with two contemporary pathogenic isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v.16, n.4., p.200-206, 2008.

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

TAJIMA, M., YAGIHASHI, T., NUNOYA, T., TAKEUCHI, A., OHASHI, F. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1928–1932, 1984.

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

THACKER, EL; THACKER, BJ; KUHN, M; HAWKINS, PA; WATERS, WR. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular

injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.1384–1389, 2000.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research**, 2004.

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

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

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

VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V. ; BONATTO, S.L.; CARVALHO, M.O.; PINTO, P.M.; ALMEIDA, D.F.; ALMEIDA, L.G.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E.N.; AZEVEDO, V.A.; BOGO, M.R.; BRIGIDO, M.M.; BROCCHI, M.; BURITY, H.A.; CAMARGO, A.A.. CAMARGO, S.S.; CAREPO, M.S.; CARRARO, D.M.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.; LOPES, M.I.; LORETO, E.L.; MADEIRA, H.M.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.; MOREIRA, M.A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.E.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.5568–5577, 2005.

VERDIN, E.; SAILLARD, C.; LABBÉ, A.; BOVÉ, J.M.; KOBISCH, M. A. nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washing from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.31–40, 2000.

VICCA, J.; MAES, D.; THERMOTTE, L.; PEETERS, J.; HAESBROUCK, F.; DE KRUIF, A. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infections in Belgian Farrow-to-

Finish Pig Herds with Diverging Disease-Course. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.49, p.349–353, 2002.

VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology**, v.97, p.177–190, 2003.

VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F. *In Vitro* Susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p.4470-4472, 2004.

VILLARREAL, I.; MAES, D.; MEYNS, T.; GEBRUERS, F.; CALUS, D.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F. Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. **Vaccine**. v.27, p.1875–1879, 2009.

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

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

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

WESTBERG, J.; PERSSON, A.; HOLMBERG, A.; GOESMANN, A.; LUNDEBERG, J.; JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). **Genome Research**, v.14, p.221–227, 2004.

WILTON, J; JENKINS; CORDWELL, S.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; ONEAL, D. C.; DJORDJEVIC, M. A.; CONNOLLY, A.; BARCHIA, I.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v.71, n.3, p.566–582, 2009.

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