

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**Caracterização de uma peroxirredoxina 1-Cys de *Mycoplasma  
hyopneumoniae* com possível papel na detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**Cláudio Xavier Machado**

**Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular da UFRGS  
como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre**

**Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira**

**Porto Alegre, março de 2009**

Este trabalho foi inteiramente realizado no Centro  
de Biotecnologia da UFRGS  
e financiado pelo Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, por sua orientação e incentivo na realização deste trabalho, e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela igual disponibilidade para tratar de assuntos referentes ao trabalho quando preciso e pela leitura crítica de minha redação científica.

Ao colega Paulo Marcos Pinto pela amizade e pelo auxílio, principalmente nas etapas iniciais da realização deste trabalho e por me passar muito do que eu sei de BioMol.

Aos colegas Lucas “Baiano” Moitinho e Luciane Schons pelo companheirismo e pelos serviços laboratoriais oportunamente prestados (e devidamente cobrados).

Às colegas Veridiana Gomes e Bianca Heineck, que nestes últimos meses foram o toque feminino no laboratório, mantendo o mesmo habitável e organizado, e ensinando coisas do tipo “detergente não serve para lavar as mãos”, inclusive introduzindo-nos ao mundo do sabonete líquido com hidratante.

Aos demais colegas que passaram pelo laboratório 210 (ou o velho 201) durante o período em que eu estive aqui, que se tornaram bons amigos nas horas vagas e mantiveram o clima agradável para o trabalho, em especial às colegas Desireé Schuck e Ana Paula Costa.

Aos funcionários do CBIot, em especial ao grande “seu Milton” e ao Paulo, da sala de limpeza, e à Silvinha e o ao Luciano da Secretaria.

A todos aqueles “desconhecidos” dos corredores que se tornaram grandes amigos e que fizeram destes meus anos no laboratório 210 um período inesquecível.

À minha família, por entender meus horários, às vezes meio estranhos, e por aceitar que “bactérias não fazem feriado”.

À Bi, pelos momentos juntos e por iluminar minhas idéias com suas “lâmpadas fluorescentes” nas horas mais obscuras.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e a pneumonia micoplásmica suína.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Sistemas de defesa contra patógenos em suínos.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Superfamília das peroxirredoxinas.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Justificativa e objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Manuscrito aceito para publicação: A peroxiredoxin from <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> with a possible role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Discussão final.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Conclusões e perspectivas.....</b>	<b>59</b>
<b>5. Referências bibliográficas citadas nas seções 1 e 3.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE 1: Comprovação de submissão do manuscrito.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE 2: Comprovação de aceite do manuscrito para publicação.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE 3: <i>Curriculum vitae</i> resumido.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDS: Seqüência de DNA codificadora (do inglês, *coding DNA sequence*)

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GPx: glutationa-peroxidases

GST: Glutationa-S-transferase

IPTG : Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

kb: Quilobase (mil pares de bases)

kDa: Quilodalton

MCO system: sistema de oxidação catalisado por metal (do inglês, metal-catalyzed oxidation system).

MhPrx: peroxirredoxina de *M. hyopneumoniae*

pb: Par de bases

PMS: Pneumonia micoplásmica suína

PRRSV: Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (do inglês, *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

SOD: superóxido-dismutases

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Colonização do epitélio de anel traqueal de suíno por *M. hyopneumoniae*..... **13**
- Figura 1.2** Mecanismo de reação de peroxirredoxinas 2-Cys típicas, atípicas e 1-Cys.....**18**

## LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

- Figure 1.** Dimerization of rMhPrx..... **33**
- Figure 2** Recombinant MhPrx peroxidase activity assayed in a MCO system..... **34**
- Figure S1.** Detection of MhPrx expression in protein extracts from different *M. hyopneumoniae* strains..... **36**
- Figure 3** Multiple sequence alignment of MhPrx and bacterial members of the atypical 2-Cys peroxiredoxin subfamily..... **38**
- Figure S2** Multiple sequence alignment of MhPrx and bacterial members of the 1-Cys peroxiredoxin subfamily..... **39**
- Figure 4** MhPrx phylogenetic relationships..... **41**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Percentual (%) de suínos com lesões de pneumonia micoplásmica em diferentes países entre os anos de 1990 e 2001.....	<b>11</b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

## LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

<b>Table S1</b> MhPrx peroxidase activity assay data set used in the ANOVA and in the Tukey's Multiple Comparison Tests.....	<b>35</b>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

## RESUMO

*Mycoplasma hyopneumoniae* é a bactéria causadora da pneumonia micoplásmica suína, que afeta o rebanho suíno em nível mundial. Durante o processo de infecção, o sistema imune de organismos afetados produz espécies reativas de oxigênio (ERO), conhecidas por causarem uma variedade de lesões celulares, como uma das estratégias para neutralização do patógeno. Embora a presença de enzimas antioxidantes clássicas seja esperada em *M. hyopneumoniae*, genes importantes relacionados à proteção contra ERO como superóxido-dismutase, catalases e glutatona-peroxidase não foram identificados por homologia na anotação de seqüências genômicas. Entre os poucos genes de *M. hyopneumoniae* codificando proteínas possivelmente envolvidas na supressão da resposta do hospedeiro através da produção de ERO, foi identificado um codificando uma peroxirredoxina. Análises de seqüência e filogenéticas mostram que a peroxirredoxina de *M. hyopneumoniae* (MhPrx) está relacionada com a subfamília das peroxirredoxinas 2-Cys atípica, embora ela tenha apenas uma cisteína em sua seqüência. A seqüência de DNA codificadora (CDS) da MhPrx foi clonada e expressa em *Escherichia coli* para a produção de uma MhPrx recombinante (rMhPrx), a qual foi purificada e usada para a imunização de camundongos para produzir um anti-soro policlonal anti-MhPx. Este anti-soro foi utilizado para investigar extratos protéicos de *M. hyopneumoniae* e demonstrou a expressão de MhPrx nas três cepas testas (J, 7422 e 7448). A atividade da rMhPrx foi determinada com uso de um sistema de oxidação catalisado por metais, que mostrou que esta enzima pode proteger moléculas de DNA do dano causado por ERO e deve ter uma função essencial durante a infecção.



## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the causative agent of the porcine enzootic pneumonia, which affects swineherds worldwide causing heavy economical losses. In the infection process, the host generates reactive oxygen species (ROS) as one of the strategies used to neutralize the pathogen. Although the presence of classical antioxidant enzymes would be expected in *M. hyopneumoniae*, important genes directly related to protection against ROS, like superoxide-dismutase, catalases and glutathione-peroxidase were not identified by sequence homology in the genome sequence annotation. Among the few identified *M. hyopneumoniae* genes coding for proteins possibly involved with suppression of the host ROS-mediated response, one coding for a peroxiredoxin was recognized. Sequence and phylogenetic analysis indicate that *M. hyopneumoniae* peroxiredoxin (MhPrx) is closely related to the atypical 2-Cys peroxiredoxin subfamily, although it has only one cysteine in its sequence. The MhPrx coding DNA sequence was cloned and expressed in *Escherichia coli* to produce a recombinant MhPrx (rMhPrx), which was purified and used to immunize mice and produce an anti-MhPrx polyclonal antiserum. This antiserum was used to probe *M. hyopneumoniae* extracts and demonstrated that MhPrx is expressed in all three tested strains (J, 7422 and 7448). A metal catalyzed oxidation system was used to assay the activity of rMhPrx, showing that it can protect DNA from ROS-mediated damage and may play an essential role during infection.

# 1. Introdução

## 1.1 *Mycoplasma hyopneumoniae* e a pneumonia micoplásmica suína

*Mycoplasma hyopneumoniae* é a bactéria causadora da pneumonia enzoótica ou pneumonia micoplásmica suína (PMS), que afeta o rebanho suíno em nível mundial. Este organismo, assim como as outras espécies pertencentes ao gênero *Mycoplasma*, é um procarionto que se distingue fenotipicamente de outras bactérias por seu tamanho diminuto e pela ausência completa de parede celular, o que os separa taxonomicamente na classe Mollicutes (do latim *mollis* = mole e *cutis* = pele) (RAZIN *et al.*, 1998). O gênero *Mycoplasma* apresenta uma série de outras características peculiares: (1) seus membros são todos parasitos obrigatórios, tanto de seres humanos como de animais, não existindo em forma livre (RAZIN, 1992); (2) aparentemente, apresentam alta especificidade por seus hospedeiros, embora PITCHER & NICHOLAS (2005) tenham encontrado evidências contrárias; (3) possuem genomas de tamanho reduzido, variando de 580 kb a 1.350 kb, provavelmente em função da sua evolução como parasitos obrigatórios (SIRAND-PUGNET *et al.*, 2007a) e os colocando entre os organismos auto-replicáveis de menor genoma conhecidos; (4) seus genomas apresentam um baixo conteúdo de C+G, girando em torno de 30% (SIRAND-PUGNET *et al.*, 2007b); (5) possivelmente devido à pressão exercida pelo elevado conteúdo de A+T no genoma, apresentam um uso de códon particular, com UGA codificando triptofano, em vez de ser um códon de terminação como na maioria dos organismos (BOVE, 1993).

A patogenicidade dos micoplasmas, associada ao tamanho reduzido de seus genomas, motivou o seqüenciamento de uma série de genomas de diferentes espécies (FRASER *et al.*, 1995; HIMMELREICH *et al.*, 1996; CHAMBAUD *et al.*, 2001; SASAKI

*et al.*, 2002; PAPAIZISI *et al.*, 2003; JAFFE *et al.*, 2004; MINION *et al.*, 2004; WESTBERG *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Estes estudos auxiliaram no sentido de entender melhor a patofisiologia destas bactérias e na da identificação de fatores de virulência. Além disso, eles visavam a auxiliar na definição do conceito de “célula mínima”, ou seja, aquela que carrega o mínimo de informação necessário à sua sobrevivência. De *M. hyopneumoniae*, foram seqüenciados os genomas de três cepas diferentes (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Desde seu primeiro isolamento de lesões pulmonares (MARE & SWITZER, 1965), *M. hyopneumoniae* tem sido descrito em diversos países como um dos agentes mais comuns envolvidos em problemas respiratórios dos suínos (Tabela 1.1). A infecção por este organismo é freqüente em todas as regiões do mundo onde se desenvolve a suinocultura, e exames realizados em diferentes países indicam que as lesões sugestivas da doença ocorrem em 30% a 80% dos suínos abatidos (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

**Tabela 1.1.** Percentual (%) de suínos com lesões de pneumonia micoplásmica em diferentes países entre os anos de 1990 e 2001. Adaptado de KICH & PONTES (2001).

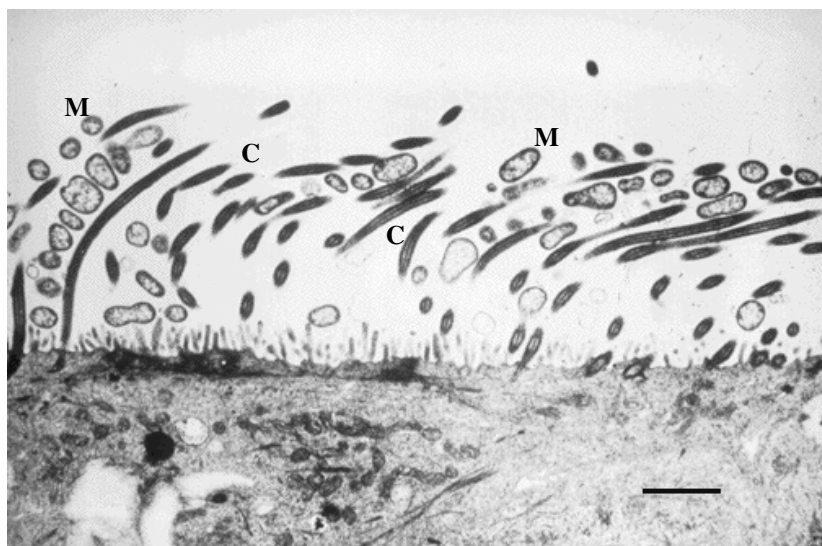
<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Percentual de suínos com lesões (%)</b>	<b>Referência</b>
Brasil	1990	52	Guerrero (1990)
Brasil	1990	55,3	Sobestianky <i>et al.</i> (1990)
Brasil	1998	59,8	Rostagno <i>et al.</i> (1999)
Brasil	1999	54,8	Sobestiansky <i>et al.</i> (1999)
Brasil	2001	75,7	Silva <i>et al.</i> (2001)
Chile	1990	84	Guerrero (1990)
Espanha	1990	38	Guerrero (1990)
EUA	1990	69	Guerrero (1990)
Filipinas	1990	89	Guerrero (1990)
Itália	1998	33,7	Martelli <i>et al.</i> (1998)
Suécia	1998	10	Lundehein <i>et al.</i> (1998)
Suíça	1998	29,9	Grest <i>et al.</i> (1998)
Tailândia	1990	95	Guerrero (1990)
Taiwan	1990	49,8	Hsu e Fang (1990)

As perdas econômicas na suinocultura decorrentes desta doença podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e 30% sobre o ganho de peso. Embora o índice de mortalidade seja baixo (no máximo 5%), a alta taxa de morbidade (que pode chegar a 60%, entre quatro e seis meses de idade) (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999) acarreta em enormes prejuízos para os produtores. Mesmo em granjas com baixos níveis de contaminação por *M. hyopneumoniae*, pode ocorrer significativo aumento no custo de produção, em razão da piora da conversão alimentar, menor ganho de peso, falta de uniformidade do lote e necessidade de utilização de antibióticos. O atraso da saída dos animais para o abate, que pode variar de seis a 25 dias, acarreta em um custo adicional de US\$ 0,60 a US\$ 2,50 por animal. Somando-se as perdas com a piora da conversão alimentar, esse custo aumenta ainda US\$ 1,80 (XAVIER, 2004).

Os prejuízos causados pela PMS, porém, podem variar em função da gravidade das lesões causadas por infecções secundárias, uma vez que *M. hyopneumoniae* aumenta a susceptibilidade a outros agentes infecciosos. CIPRIAN *et al.* (1988) mostraram que a infecção de suínos por *Pasteurella multocida* concomitantemente com *M. hyopneumoniae* determinou o surgimento de febre alta, tosse severa e vastas lesões pulmonares, enquanto a infecção por apenas um ou outro agente não resultou em um efeito tão grave. Da mesma forma, a co-infecção por *M. hyopneumoniae* e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) acarretou em uma maior concentração de RNA viral nos tecidos linfóide e tonsilar de suínos infectados com isolados muito virulentos, bem como o aumento da abundância viral em *swab* orofaríngeo e amostras de sangue, independente da virulência do isolado de PRRSV (CHO *et al.*, 2006).

Quando em contato com seu hospedeiro, o suíno, *M. hyopneumoniae* interage com os cílios das vias respiratórias (Figura 1.1), podendo causar ciliostase (parada do

movimento ciliar) e perda de cílios. DeBEY & ROSS (1994) descreveram que a aderência, ou pelo menos uma associação próxima da bactéria ao epitélio ciliado dos suínos, parece ser necessária para induzir tais mudanças. Esta alteração inicia um processo que leva ao quadro clínico caracterizado como a PMS, o que faz de *M. hyopneumoniae* seu agente causador primário. A PMS é uma doença crônica infecciosa, muito contagiosa, caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente, se manifesta por tosse seca, atraso no ganho de peso, alta morbidade, baixa mortalidade e, geralmente, é acompanhada de complicações broncopulmonares purulentas (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). O suíno parece ser o único hospedeiro de *M. hyopneumoniae* e a transmissão ocorre por contato direto com as secreções do aparelho respiratório e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse. A maior fonte de infecção, no entanto, é a fêmea em período de amamentação, que transmite a doença à sua leitegada logo após o nascimento (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).



**Figura 1.1** Colonização do epitélio de anel traqueal de suíno por *M. hyopneumoniae* (M) 5 dias após infecção: (C) cílios; barra: 0,83  $\mu$ m. Adaptado de DeBEY & ROSS, 1994.

## 1.2 Sistemas de defesa contra patógenos em suínos

Da mesma forma que ocorre nos mamíferos em geral, no suíno o sistema de defesa é representado pelos mecanismos de defesa não-específicos, os quais estão presentes nos animais normais e saudáveis, e os mecanismos de defesa específicos e induzidos, os quais se desenvolvem a partir do contato do animal com um determinado agente infeccioso ou substância estranha ao organismo. Nas vias respiratórias, os mecanismos de defesa não-específicos são compostos por fatores físicos/químicos (estrutura da cavidade nasal, epitélio ciliar recoberto com muco, reflexo da tosse e espirro, sistema complemento, etc.) e fatores celulares (linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos). O sistema de defesa específico e induzido corresponde à imunidade humoral, representada pelas imunoglobulinas específicas (IgG, IgM, IgA e IgE), e à imunidade mediada por células, ou imunidade celular (linfócitos T, macrófagos ativados, etc.) (GOLDSBY *et al.*, 2003).

O sistema de defesa não-específico é a primeira barreira contra a invasão do sistema respiratório por agentes causadores de distúrbios, além de ser um componente essencial para o desencadeamento da resposta imune específica. Ele envolve, entre outros, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por células específicas do sistema imune inato numa tentativa de neutralizar o agente invasor. Macrófagos e neutrófilos reconhecem patógenos por meio de receptores na superfície celular, capazes de distinguir moléculas de superfície exógenas. A ligação de vários desses receptores celulares irá levar ao processo de fagocitose, pelo qual o agente estranho será internalizado e destruído dentro de uma vesícula – denominada fagossomo. Esse processo depende da produção de diversas toxinas, sendo as mais importantes o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico (NO), geralmente tóxicos a bactérias. Esses compostos são gerados por oxidases lisossomais e óxido nítrico sintetases dependentes de NADPH e outras enzimas,

em um processo denominado explosão respiratória (do inglês, *respiratory burst*), por ser acompanhado de um aumento no consumo de oxigênio nestas células (JANEWAY Jr. *et al.*, 2001). Tanto ERO quanto as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são capazes de causar uma série de lesões celulares, incluindo danos ao DNA e a diversas outras biomoléculas (NATHAN & SHILOH, 2000). Em suínos, há uma variação na resposta através da explosão respiratória, sendo os animais mais jovens menos capazes de produzir este tipo de resposta e, conseqüentemente, mais suscetíveis à infecção por *M. hyopneumoniae* (du MANOIR *et al.*, 2002).

A importância deste processo para o sistema imune de mamíferos pode ser evidenciada em seres humanos que sofrem da doença granulomatosa crônica. Esses pacientes apresentam uma deficiência genética e não expressam NADPH-oxidase, o que significa que suas células fagocitárias não produzem derivados de oxigênio. Os fagócitos desses indivíduos são perfeitamente capazes de engolfar e processar bactérias e outros patógenos, mas diversos desses patógenos não são mortos nesse processo e acabam liberados em forma viável quando a célula do hospedeiro morre. Pessoas com esta enfermidade são muito mais susceptíveis a doenças bacterianas e fúngicas, sofrendo constantemente de infecções múltiplas e persistentes de organismos como *Staphylococcus aureus* (CURNUTTE & BABIOR, 1987).

Muitos patógenos adquiriram sistemas de defesa contra este mecanismo, que evitam que sejam destruídos por células fagocitárias. Algumas bactérias Gram-positivas se cobrem com um envoltório polissacarídeo muito espesso, incapaz de ser reconhecido pelos receptores dos fagócitos ou pelo sistema complemento. Outros organismos são fagocitados, mas escapam da morte, como é o caso de *Mycobacterium tuberculosis*, que evita que o fagossomo mature e assim sobrevive. Há ainda aqueles que são fagocitados e secretam

enzimas de detoxificação que revertem os efeitos negativos dos produtos da explosão respiratória no fagossomo, saindo ilesos desse processo (ALBERTS *et al.*, 2002). Estudos indicam que *M. hyopneumoniae* tem a capacidade de evitar a fagocitose por macrófagos e a produção de anticorpos nos primeiros estágios de infecção da PMS, mas uma vez estabelecido no epitélio traqueal ciliado, linfócitos se infiltram no local recrutando macrófagos e neutrófilos (CARUSO & ROSS, 1990; ROSS, 1992). É provável, portanto, que a partir deste período *M. hyopneumoniae* tenha que lidar com as ERO produzidas através da explosão respiratória no suíno.

### **1.3 Superfamília das peroxirredoxinas**

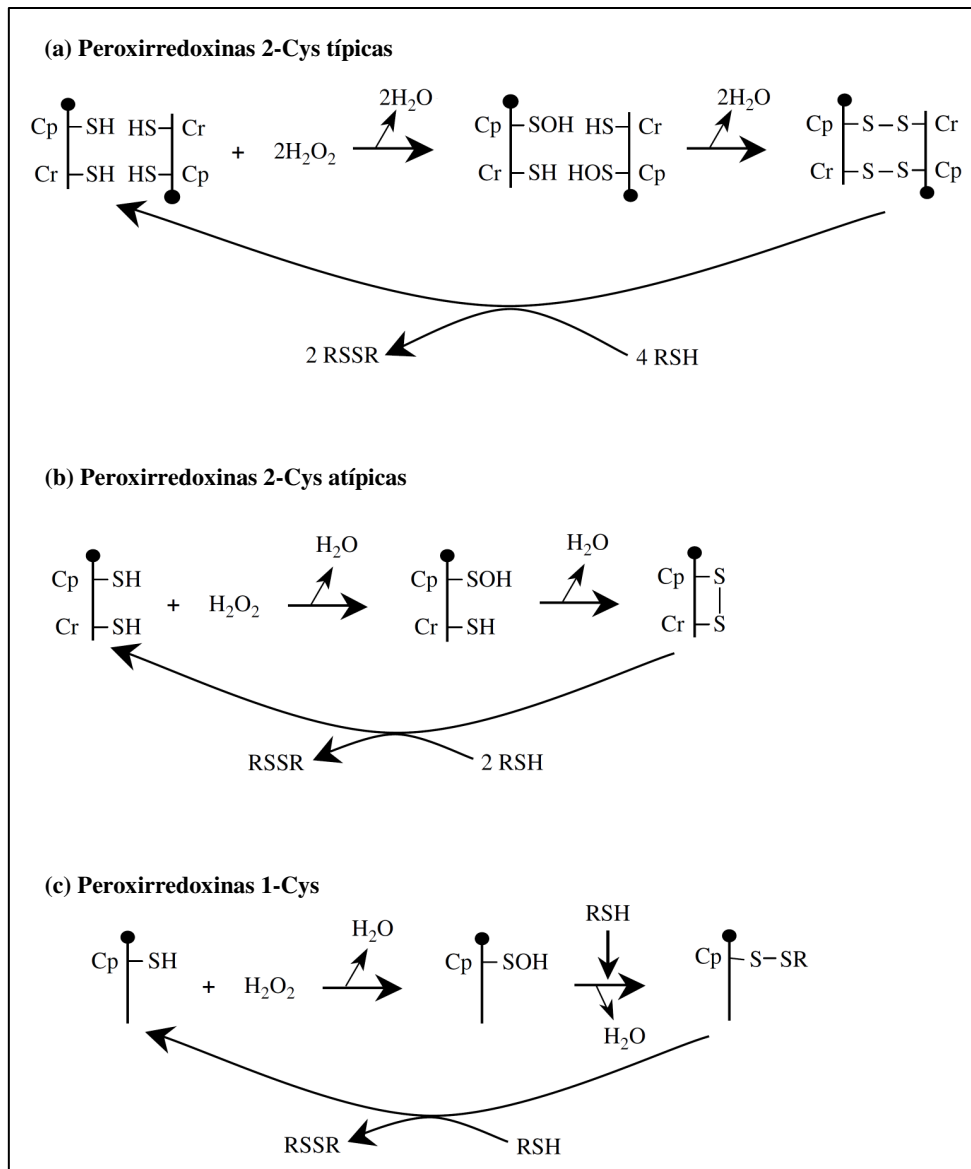
A superfamília das peroxirredoxinas começou a ser caracterizada recentemente, sendo o primeiro representante descrito em *Saccharomyces cerevisiae* (KIM *et al.*, 1988). Àquela época, começou a se perceber que se tratava de uma superfamília com membros presentes tanto em procariotos quanto em eucariotos (PROSPERI *et al.*, 1993; CHAE *et al.*, 1994; CHA *et al.*, 1995). Mais tarde, ficou demonstrado que praticamente todos os organismos vivos, incluindo anaeróbios, expressam estas enzimas em grandes quantidades (HOFMANN *et al.*, 2002). As peroxirredoxinas são peroxidases multifuncionais dependentes de tiol que catalisam a redução de diversos substratos de peróxido, como hidroperóxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), outros hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito (BRYK *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2002; KNOOPS *et al.*, 2007). Em *Escherichia coli*, as peroxirredoxinas estão entre as dez proteínas mais expressas (LINK *et al.*, 1997) e, em células de mamíferos, elas representam de 0,1% a 0,8% do total de proteínas solúveis (SEO *et al.*, 2000).



Análises de seqüência, estudos bioquímicos, estruturais e moleculares envolvendo substituição de resíduos de aminoácidos específicos permitiram esclarecer o mecanismo de ação destas proteínas, que se revelou ser relativamente simples do ponto de vista químico (WOOD *et al.*, 2003). Ele está fundamentalmente relacionado com a oxidação do grupo tiol de uma cisteína (conhecida como cisteína peroxidática) da região N-terminal enzima a ácido sulfênico, na reação de redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou outros hidroperóxidos orgânicos a água ou seus respectivos alcoóis. Resíduos de aminoácidos espacialmente próximos à cisteína peroxidática auxiliam na criação de um espaço de baixo pK<sub>a</sub> que facilita a ionização do grupo tiol a ânion tiolato. Dentre estes resíduos, se destacam uma treonina e uma arginina, que juntamente com a cisteína peroxidática formam a chamada tríade catalítica.

A resolução do ácido sulfênico formado nesta primeira etapa da reação difere de acordo com o tipo de peroxirredoxina e é o critério utilizado para fazer a classificação destas proteínas em subfamílias. A presença ou ausência de uma segunda cisteína (cisteína de resolução) divide os membros da superfamília em 1-Cys ou 2-Cys (SEO *et al.*, 2000; WOOD *et al.*, 2003). No caso das peroxirredoxinas 1-Cys, a redução do ácido sulfênico é feita diretamente por um agente externo (por exemplo, glutathiona reduzida ou ascorbato). Já nas peroxirredoxinas 2-Cys, a cisteína de resolução está envolvida na formação de uma ponte dissulfeto com a cisteína peroxidática, que estabiliza a proteína enquanto ela não é reduzida para sua forma original por um agente redutor (normalmente, tiorredoxina). Esta ponte dissulfeto pode ocorrer de duas maneiras, dependendo da proteína envolvida; na primeira, a ponte é formada entre duas subunidades, enquanto na segunda a ponte é formada intramolecularmente entre as cisteínas de um mesmo polipeptídeo. De acordo com essas duas formas de resolução do ácido sulfênico, as proteínas do grupo 2-Cys foram posteriormente divididas em 2-Cys típicas (ponte dissulfeto intermolecular) e 2-Cys

atípicas (ponte dissulfeto intramolecular) (KNOOPS *et al.*, 2007). Os mecanismos de ação das diferentes subfamílias de peroxirredoxinas estão ilustrados na Figura 1.2.



**Figura 1.2** Mecanismo de reação de peroxirredoxinas 2-Cys típicas (a), 2-Cys atípicas (b) e 1-Cys (c).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou peróxidos inorgânicos (ROOH) são reduzidos pela cisteína catalítica, que se oxida a ácido sulfênico (-SOH). Nas peroxirredoxinas 2-Cys, este -SOH reage rapidamente com uma segunda cisteína para formar uma ponte dissulfeto intermolecular (2-Cys típicas) ou intramolecular (2-Cys atípicas). Esta ponte dissulfeto é então reduzida por um doador de elétron contendo tiol. Nas peroxirredoxinas 1-Cys, o agente redutor externo (RSH) age diretamente sobre o -SOH. Os círculos escuros representam a região N-terminal de cada peptídeo. Adaptado de KNOOPS *et al.* (2007).

Em procariotos e em alguns eucariotos parasitários, as peroxirredoxinas têm se demonstrado importantes para a detoxificação tanto de ERO quanto de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito (BRYK *et al.*, 2000). Já em eucariotos, como leveduras, plantas e mamíferos, a função antioxidante destas enzimas passou a ter menor relevância, sendo elas responsáveis primeiramente pela regulação da sinalização celular através de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (WOOD *et al.*, 2003).

Baseado nos dados obtidos no seqüenciamento dos genomas das cepas 7448 e J [ATCC 25934] de *M. hyopneumoniae* (VACONCELOS *et al.*, 2005), foi possível identificar, em ambos, uma seqüência de DNA codificadora (CDS) que codifica uma proteína de 164 aminoácidos e massa molecular estimada de 18,6 kDa, com considerável homologia às peroxirredoxinas existentes em bancos de dados, incluindo as de *Mycoplasma mobile*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma pulmonis*. Ainda de acordo com a análise *in silico* dos dados gerados no seqüenciamento genômico, não foram encontradas seqüências ortólogas a diversas proteínas envolvidas nas rotas de detoxificação de ERO comuns a diversos organismos, desde procariotos até eucariotos. CDSs correspondentes a superóxido-dismutases (SOD), catalases e glutathione-peroxidases (GPx), que são enzimas clássicas envolvidas nessas vias, não puderam ser identificadas no genoma de *M. hyopneumoniae*. Reforçando esta constatação, a análise dos genomas de *Mycoplasma* spp. já seqüenciados demonstrou que apenas em um deles (o de *M. penetrans*) foi identificado um gene ortólogo que potencialmente codifica uma dessas enzimas (GPx) (SASAKI *et al.*, 2002).

A ausência de ortólogos a estas enzimas mostra que o sistema de proteção contra ERO em *M. hyopneumoniae* é relativamente deficiente. Superóxido-dismutases são metaloenzimas capazes de dismutar o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (McCORD &

FRIDOVICH, 1969). Catalase é a enzima responsável pela degradação direta de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , enquanto peroxidases em geral removem  $\text{H}_2\text{O}_2$  por usá-lo para oxidar outro substrato (no caso da GPx, através da oxidação de glutathiona reduzida – GSH – como exemplificado na reação:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ ) (ALBERTS *et al.*, 2002). Assim, esta peroxirredoxina de *M. hyopneumoniae* se apresenta como uma das poucas enzimas relacionadas à remoção de ERO já descritas neste organismo.

#### 1.4 Justificativa e objetivos

Alguns estudos têm demonstrado que as peroxirredoxinas de diferentes organismos patogênicos estão associadas à virulência (MISSALL *et al.*, 2004; KIKUCHI *et al.*, 2005; TAVARES *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005). Portanto, é cabível cogitar-se que a peroxirredoxina de *M. hyopneumoniae* (MhPrx) desempenha um papel importante no processo de infecção desta bactéria. Assim, dentre as proteínas identificadas a partir do seqüenciamento de *M. hyopneumoniae*, a MhPrx se apresenta como um possível fator de virulência ou patogenicidade deste organismo.

A seqüência de aminoácidos deduzida da MhPrx de *M. hyopneumoniae* contém apenas um resíduo de cisteína (Cys57), o que a enquadraria necessariamente na subfamília 1-Cys. No entanto, a análise da seqüência de ortólogos indica uma grande similaridade com representantes da subfamília 2-Cys atípica, enquanto a semelhança com membros da subfamília 1-Cys não é significativa.

O objetivo geral deste trabalho é dar início ao estudo da MhPrx visando tanto a descobrir a sua função nesta bactéria quanto a entender seu mecanismo de ação, possivelmente auxiliando na elucidação do ciclo catalítico das peroxirredoxinas 1-Cys, que não está totalmente esclarecido. Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) clonagem da CDS da MhPrx e expressão da enzima recombinante (rMhPrx) em *Escherichia coli*;
- b) análise comparativa da expressão da MhPrx em cepas de *M. hyopneumoniae*;
- c) caracterização funcional da rMhPrx;
- d) análises filogenéticas para posicionamento evolutivo da MhPrx em relação a enzimas ortólogas de outras espécies de *Mycoplasma* e de outras bactérias.

## **2. Manuscrito aceito para publicação: A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification**

O manuscrito apresentado a seguir como corpo principal desta dissertação foi submetido à revista *Microbiology* em 12 de fevereiro de 2009 (ver Apêndice 1). Após análise do Editor e dos *referees*, o manuscrito foi revisado e resubmetido, sendo aceito para publicação em 06 de julho de 2009 (ver Apêndice 2). Ele trata de uma peroxirredoxina (MhPrx) com propriedades particulares que a torna uma enzima interessante tanto como um possível fator de virulência quanto de um ponto de vista evolutivo da superfamília das peroxirredoxinas. A MhPrx é expressa em altos níveis nas três cepas de *M. hyopneumoniae* testadas, e a proteína recombinante mostrou atividade de proteção de DNA contra danos causados por ERO. Além de ser uma das poucas proteínas expressas em *M. hyopneumoniae* relacionadas à proteção contra ERO, a MhPrx é a primeira a ser funcionalmente expressa. Quanto a seu mecanismo de ação, a MhPrx é diferenciada por ter apenas um resíduo de cisteína, apesar de apresentar maior similaridade ao longo de sua seqüência com peroxirredoxinas do tipo atípicas 2-Cys (dependentes de duas cisteínas). Estudos filogenéticos indicam que a MhPrx deve ter evoluído a partir de uma peroxirredoxina 2-Cys atípica perdendo uma cisteína mas mantendo sua atividade catalítica, uma característica não descrita em outras peroxirredoxinas e que pode auxiliar na compreensão da evolução desta superfamília.

Todo o trabalho experimental descrito no artigo foi executado pelo primeiro autor. O estudante de doutorado do PPGBCM Paulo Marcos Pinto teve participação nas etapas iniciais de projeção de primers, mutagênese sítio-dirigida e clonagem da CDS da MhPrx.

**Title:**

A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification

**Running title:**

A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae*

**Contents category:**

Microbial Pathogenicity

**Authors:**

Cláudio X. Machado<sup>1</sup>, Paulo M. Pinto<sup>1</sup>, Arnaldo Zaha<sup>1,2</sup>, Henrique B. Ferreira<sup>1,2,§</sup>

§ corresponding author

**Laboratory and address:**

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

**Correspondence:**

Henrique B. Ferreira

[henrique@cbiot.ufrgs.br](mailto:henrique@cbiot.ufrgs.br)

Phone: +55 (51) 33087768

Fax: +55 (51) 33086079

## Summary

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the causative agent of the porcine enzootic pneumonia, which affects swineherds worldwide causing heavy economical losses. In the infection process, this bacterium is exposed to reactive oxygen species (ROS) from its own metabolism or generated by the host as one of the strategies used to neutralize the pathogen. Although the presence of classical antioxidant enzymes would be expected in *M. hyopneumoniae*, important genes directly related to protection against ROS, like superoxide-dismutase, catalases and glutathione-peroxidase were not identified by sequence homology in the genome sequence annotation. Among the few identified *M. hyopneumoniae* genes coding for proteins possibly involved with suppression of ROS-mediated damage, one coding for a peroxiredoxin was recognized. Sequence and phylogenetic analyses indicate that *M. hyopneumoniae* peroxiredoxin (MhPrx) is closely related to the atypical 2-Cys peroxiredoxin subfamily, although it has only one cysteine in its sequence. The MhPrx coding DNA sequence was cloned and expressed in *Escherichia coli* to produce a recombinant MhPrx (rMhPrx), which was purified and used to immunize mice and produce an anti-MhPrx polyclonal antiserum. This antiserum was used to probe *M. hyopneumoniae* extracts and demonstrated that MhPrx is expressed in all three tested strains (J, 7422 and 7448). Cross-linking assays and size exclusion chromatography indicate that rMhPrx forms dimers, as has been established for atypical 2-Cys peroxiredoxins. Furthermore, a metal catalyzed oxidation system was used to assay the activity of rMhPrx, showing that it can protect DNA from ROS-mediated damage and may play an essential role during infection.



## Introduction

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the causative agent of porcine enzootic pneumonia (Mare & Switzer, 1965), which affects swineherds worldwide. This highly contagious disease is characterized by a mild but chronic pneumonia that leads to low mortality but high morbidity (Messier *et al.*, 1990). Along with growth retardation, and reduced feed conversion, the costs associated with currently available antibiotic treatments lead to heavy economic losses to swine production (Maes *et al.*, 2008). In the infection process, the bacteria adhere to ciliated epithelial cells in the respiratory tract of the host causing ciliostasis and loss of cilia (DeBey & Ross, 1994). The damaged tracheal epithelium compromises the main defense of the host against aerosol-transmitted diseases and raises the risk and intensity of secondary infections by pathogens such as *Pasteurella multocida* (Ciprian *et al.*, 1988) and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Cho *et al.*, 2006).

*M. hyopneumoniae* avoids swine defense mechanisms during early stages of pneumonia by inhibiting macrophage-mediated phagocytosis and B-cell antibody production (Caruso & Ross, 1990; Ross, 1992). After the pathogen is established in the ciliated epithelium, lymphocytes infiltrate the site of infection, recruiting macrophages and neutrophils. Cellular immune responses in swine also include the production of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and superoxide anions ( $\text{O}_2^-$ ), in a process known as the respiratory burst, which may kill an infective organism (du Manoir *et al.*, 2002).

Apart from ROS produced by the host immune response, *M. hyopneumoniae* can be also exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  generated endogenously. Recent studies demonstrate that other mycoplasmas can generate  $\text{H}_2\text{O}_2$  or ROS as byproducts of the glycerol metabolism,

involving genes such as *glpO* or *glpD* (Pilo et al., 2005; Bischof et al., 2009, Hames et al., 2009). These metabolites can be translocated to the host cell, being involved in toxicity toward the host (Vilei & Frey, 2001; Bischof et al., 2008). A *glpD* gene has been identified in *M. hyopneumoniae* genome sequence and the corresponding protein has similarity levels of 64% and 63% to the well-characterized GlpD of *M. pneumoniae* and GlpO of *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, respectively.

On the other hand the *M. hyopneumoniae* genome lacks genes coding for some important antioxidant proteins, such as catalases, glutathione-peroxidase and superoxide-dismutase (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005), and no one of the at least four ROS-protection related genes annotated in the *M. hyopneumoniae* genome (namely thiol peroxidase, peptide methionine sulfoxide reductase, thioredoxin, and thioredoxin reductase) was found to be transcriptionally upregulated under oxidative stress culture conditions (Schafer et al., 2007). However, since it is essential to *M. hyopneumoniae* to avoid ROS-mediated damage during infection, these observations are likely to be consequence of evolutive events, including loss of genes and/or divergence from common orthologs, and of a possible constitutive mode of expression for at least some of the antioxidant proteins available for this species.

Among the so far identified *M. hyopneumoniae* genes coding for putative ROS-protection proteins, one (*tpx*) coding for a peroxiredoxin was recognized by sequence homology and originally annotated as a probable thiol-peroxidase (Vasconcelos et al., 2005). The peroxiredoxin superfamily comprises multifunctional thiol-dependent peroxidases that catalyze the reduction of various peroxide substrates, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxynitrite and organic hydroperoxides (Bryk et al., 2000; Castro et al., 2002; Knoops et al., 2007), and their basic mechanism relies on the oxidation of a peroxidatic cysteine

residue in the active site to a sulfenic acid by the peroxide substrate (Rhee *et al.*, 2005). The *M. hyopneumoniae tpx* gene codes for a 164 aa-long protein (MhPrx), with a single cysteine residue in the deduced sequence (Cys57). In this study, recombinant MhPrx (rMhPrx) was characterized and assayed for peroxidase activity. *In vivo* expression of MhPrx was analyzed and the phylogenetic relationships of this putative alternative form of peroxiredoxin are discussed.

## Methods

### ***M. hyopneumoniae* strains, culture and protein extraction**

*M. hyopneumoniae* non-pathogenic strain J (ATCC 25934) was acquired from American Type Culture Collection by the EMBRAPA-CNPSA (Concórdia, Brazil). *M. hyopneumoniae* pathogenic strain 7448 was isolated from infected swine from Lindóia do Sul (Brazil) (Vasconcelos *et al.*, 2005). *M. hyopneumoniae* pathogenic strain 7422, another Brazilian field isolate, was obtained from the EMBRAPA-CNPSA collection. *M. hyopneumoniae* cultivation and protein extraction were performed as described in Pinto *et al.* (2007).

### **Site directed mutagenesis and cloning of the *tpx* gene**

The complete 495 bp *tpx* coding DNA sequence (CDS) was obtained from an *E. coli* pUC18 clone used in the genome sequencing of *M. hyopneumoniae* 7448 (Vasconcelos *et al.*, 2005). A Trp-encoding TGA codon was mutated to TGG using the megaprimer PCR method (Angelaccio & Bonaccorsi di Patti, 2002) with the following primers: 5'-TTAGGAAAATTTTTTTAGATTTTCTTC-3' (external reverse primer); 5'-GCCCAATTGGAAAGATGCTAATTTAG-3' (mutagenic internal primer, with the mutated codon underlined); and 5'- ATGCAGACAAAATTTAAAAATAAATC-3' (external forward primer).

The mutated *tpx* CDS was cloned into the pGEX-4T-1 expression vector (GE Healthcare) for expression as a fusion with glutathione-S-transferase (GST). The resultant pGEX-4T-1::*tpx* construct was confirmed by sequencing.

## **Recombinant MhPrx expression and purification**

Fresh cultures of *E. coli* BL21 containing pGEX-4T-1::tpx were induced with 0.8 mM IPTG at 28 °C for 16 h. Cells were harvested, resuspended in PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) and sonicated at 75 Hz in an ice bath. Triton X-100 (Sigma) was added to a final concentration of 2% and the cell extract was centrifuged at 13,000 g for 30 min. Purification was performed in a Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) affinity column following the manufacturer's recommendations. The rMhPrx was recovered free of the GST tag after on-column proteolytic cleavage with thrombin (Sigma) at 22 °C for 16 h. The concentration of rMhPrx was determined by SDS-PAGE analysis of serial dilutions compared to known quantities of BSA using a GS-800 densitometer (Bio-Rad) and the Quantity One v. 4.6.3 software (Bio-Rad).

## **Size exclusion chromatography**

Five hundred micrograms of rMhPrx in PBS were individually loaded onto a Superdex 75 HR 10/30 (separation range: 3,000 – 70,000 Da) column (Pharmacia Biotech) previously equilibrated in PBS. Chromatography was performed on a Pharmacia FPLC system (Pharmacia Biotech) at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature and the absorbance was monitored at 280 nm. The column was calibrated using protein molecular mass standards under the same conditions.

## **Cross-linking assay**

Cross-linking assays were carried out as described by Monteiro *et al.* (2007b). Shortly, 80 µL of a 3 mg mL<sup>-1</sup> solution of rMhPrx in PBS was incubated with 0.1%

glutaraldehyde (v/v) at room temperature. Ten-microliter aliquots were collected at different times and reactions were stopped by adding SDS sample buffer and boiling at 100 °C for 5 min. Cross-linked products were analyzed under reducing conditions on 15% SDS-PAGE.

### ***In vitro* peroxidase activity assay**

For each batch of purified rMhPrx, peroxidase activity was assessed in triplicates using a MCO system (Li *et al.*, 2004), with some modifications. Reaction mixtures of 20  $\mu\text{L}$  contained 150  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ , 10 mM DTT, 0.1  $\mu\text{g}$  pUC18 supercoiled DNA  $\mu\text{L}^{-1}$ , 0.1 mM EDTA, 25 mM Tris pH 7.5. DNA nicking was assayed in the absence or presence of two concentrations (3.75  $\mu\text{M}$  and 7.5  $\mu\text{M}$ ) of rMhPrx, in the presence of 7.5  $\mu\text{M}$  GST (negative control) and in the absence of  $\text{Fe}^{3+}$  (positive control). Fractions of 5  $\mu\text{L}$  were collected at different times, inactivated with EDTA to a final concentration of 50 mM and electrophoretically analyzed. Gels were photographed with Gel Doc XR (Bio-Rad) and the Quantity One v. 4.6.3 software (Bio-Rad) was used to estimate the relative concentrations of the observed bands. The percentage of plasmid supercoiled DNA remaining in each treatment after 2 h of incubation was compared using one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Tests at a 5% significance level. All statistic analyses were performed with SPSS v. 14.0 (<http://www.spss.com/>).

### **Western blotting**

Anti-serum was produced by the immunization of three 60-day BALB/c mice with four doses of 20  $\mu\text{g}$  of rMhPrx, with 14 days intervals. Individual sera were pooled to form the so-called anti-MhPrx serum. All procedures and experiments involving animals were

performed according to Brazilian laws and were approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*M. hyopneumoniae* total protein extracts (80 µg/lane) were fractionated on 15% SDS-PAGE gels and then transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were blocked with 5% (w/v) skim milk powder in PBS (blotto-PBS) and incubated with anti-MhPrx serum or pre-immune serum. Antimouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Sigma) served as the secondary antibody and reactions were visualized with the ECL Plus kit (GE Healthcare).

### **Sequence and phylogenetic analyses**

The NCBI BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to search for orthologs of the MhPrx deduced amino acid sequence in the updated GenBank/EMBL and SWISS-PROT databases. Multiple sequence alignments of MhPrx and other peroxiredoxins were performed with Muscle v. 3.6 software (<http://www.genebee.msu.su>) and edited using GenDoc v. 2.7.0 (<http://www.genedoc.us>). Phylogenetic relationships were determined using the neighbor-joining (NJ) method and MEGA v. 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

## **Results**

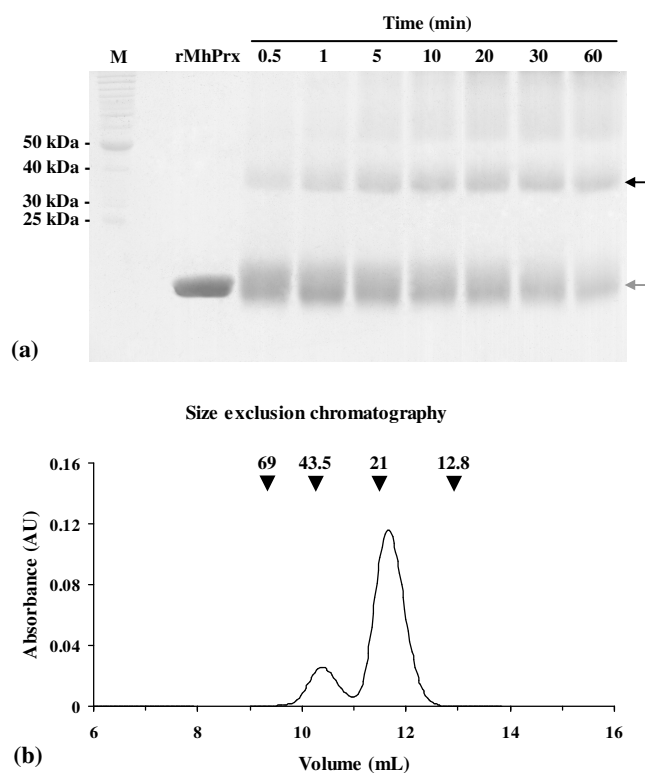
### **Recombinant MhPrx production**

The rMhPrx was overexpressed in *E. coli* and purified to homogeneity free of the fusion with GST tag. After cleavage with thrombin, the resulting peptide was equal to the native protein deduced sequence plus a GSPELGTL amino acid extension appended to its N-terminus, resulting from the cloning approach. On SDS-PAGE analysis (Fig. 1a, lane rMhPrx), a single band was observed with a molecular mass of approximately 18.5 kDa, as expected.

### **Recombinant MhPrx dimerization**

The rMhPrx dimerization was first tested by glutaraldehyde cross-linking experiments. Results show that a band with apparent molecular mass of a MhPrx dimer is visualized with a concentration of 0.1% glutaraldehyde from 0.5 min incubation and that this association is further stabilized with longer incubation times (Fig 1a). In a second approach, size exclusion chromatography was used to examine the rMhPrx apparent molecular mass in non-denaturing conditions. The elution profile revealed a major peak with the apparent molecular mass of a MhPrx monomer and a secondary peak with the apparent molecular mass of a MhPrx dimer (Fig. 1b). SDS-PAGE analysis confirmed the presence of the 18.5 kDa rMhPrx in all fractions collected from both peaks (data not shown).



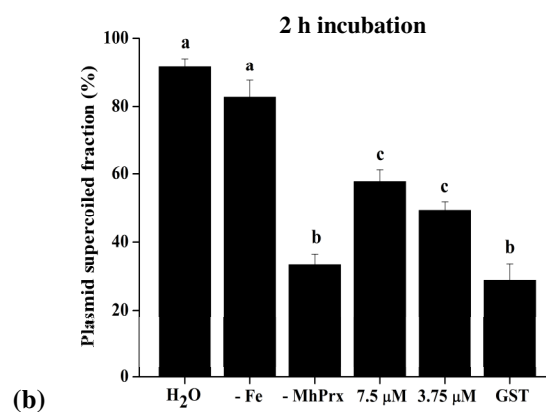
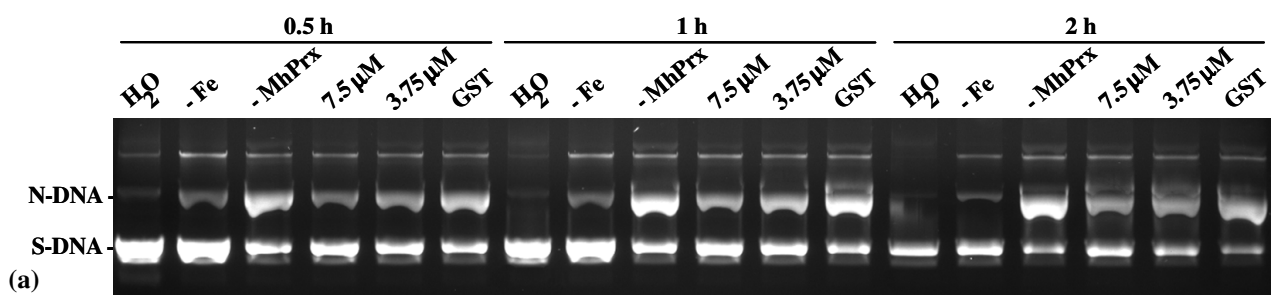


**Fig. 1. Dimerization of rMhPrx.** (a) rMhPrx was cross-linked with 0.1% glutaraldehyde for 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 and 60 min, as indicated (top), and separated on 15% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. The gray arrow indicates the expected molecular mass of MhPrx monomer (18.5 kDa). The black arrow indicates the cross-linked products of approximately 37 kDa, the expected molecular mass of the dimeric form of MhPrx. The relevant molecular mass standards are indicated (lane M). The purified recombinant MhPrx (rMhPrx) was also included for reference. (b) Elution profile of rMhPrx chromatographed on a Superdex 75 HR 10/30 column. BSA (69 kDa), ovalbumin (43.5 kDa), soybean trypsin inhibitor (21 kDa) and cytochrome c (12.8 kDa) were used as molecular mass standards and their positions are indicated by arrowheads (top).

### Peroxidase activity of rMhPrx

A MCO system was used to evaluate whether rMhPrx can protect supercoiled DNA from degradation. The extent of DNA damage was evaluated by the relative quantification of electrophoretically resolved pUC18 supercoiled and nicked (linear) forms in each sample. Results obtained with a representative batch of purified rMhPrx are presented in Fig. 2 and Table S1. Fig. 2(b) displays the percentage of supercoiled DNA remaining after

2 h of incubation. In the absence of  $\text{Fe}^{3+}$ , no nicking of plasmid DNA was observed in comparison to plasmid incubated in water, whereas the same reaction including  $\text{Fe}^{3+}$  caused a statistically significant decrease of the band corresponding to pUC18 supercoiled DNA. The addition of rMhPrx at two concentrations (3.75  $\mu\text{M}$  and 7.5  $\mu\text{M}$ ) prevented nicking of the supercoiled DNA in the assay in comparison with the plasmid incubated with the MCO system, but with no significant difference between the two concentrations of enzyme. No protection of plasmid DNA was observed with 7.5  $\mu\text{M}$  GST. The described experiment was repeated for different batches of purified rMhPrx, always with equivalent results (data not shown).



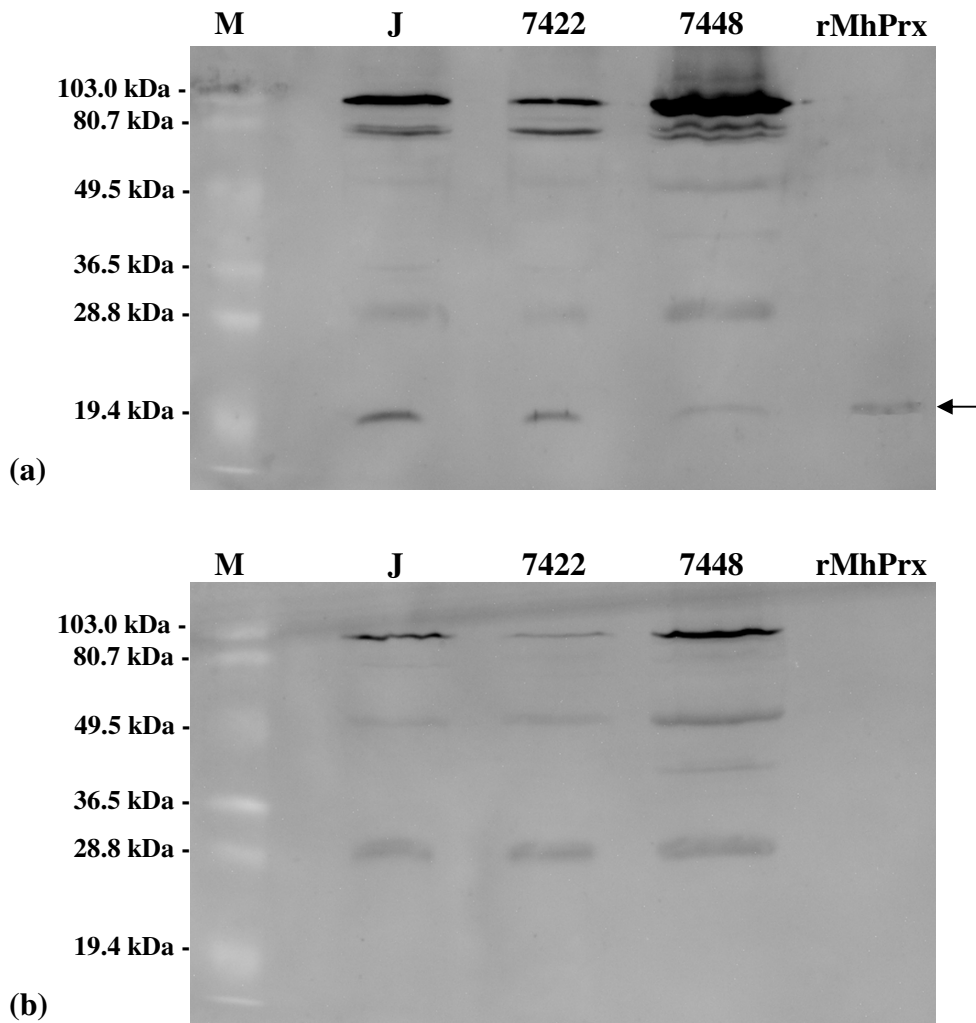
**Fig. 2. Recombinant MhPrx peroxidase activity assayed in a MCO system.** (a) Fractions were collected from the different treatment tubes and electrophoretically analyzed in 1% agarose gel. The nicked form (N-DNA) and the parental supercoiled form (S-DNA) of pUC18 are indicated. Fractions are from incubation of pUC18 in water (H<sub>2</sub>O), in the MCO system without FeCl<sub>3</sub> (positive control; -Fe), and in the MCO system without rMhPrx (negative control; -Prx) or in the presence of two different concentrations of rMhPrx (7.5 μM and 3.75 μM); purified GST (7.5 μM; GST) was also used in place of MhPrx as a negative control. Incubation time and the different conditions are shown above each lane. (b) Fraction (%) of supercoiled DNA remaining after 2 h of incubation. Treatments with no statistically significant difference (at a 5% level) in Tukey's Multiple Comparisons Tests are grouped with the letters a, b, and c. The percentage values represent the relative intensity of the supercoiled band, in comparison to the sum of intensities of the supercoiled band and the nicked band, for each treatment. Intensities were measured by densitometry from three repeats using a single batch of purified rMhPrx. Standard deviations are shown.

**Table S1.** MhPrx peroxidase activity assay data set used in the ANOVA and in the Tukey's Multiple Comparison Tests. The value ranges are also shown. The replicates I-III data represent the percentage of supercoiled DNA remaining after 2 h of incubation for each treatment. The results were obtained with a single representative batch of purified MhPrx.

Treatment	Replicate I	Replicate II	Replicate III	Mean	Standard deviation	Value range
H <sub>2</sub> O	92.6	93.5	88.6	91.6	2.6	4.9
- Fe	86.8	84.2	77.4	82.8	4.8	9.4
- MhPrx	30.1	35.9	34.5	33.5	3.0	5.8
7.5 μM	61.6	56.5	55.4	57.8	3.3	6.2
3.75 μM	52.2	49.3	47.4	49.6	2.4	4.8
GST	24.6	34.3	27.0	28.7	5.1	9.7

### Demonstration of MhPrx expression in different *M. hyopneumoniae* strains

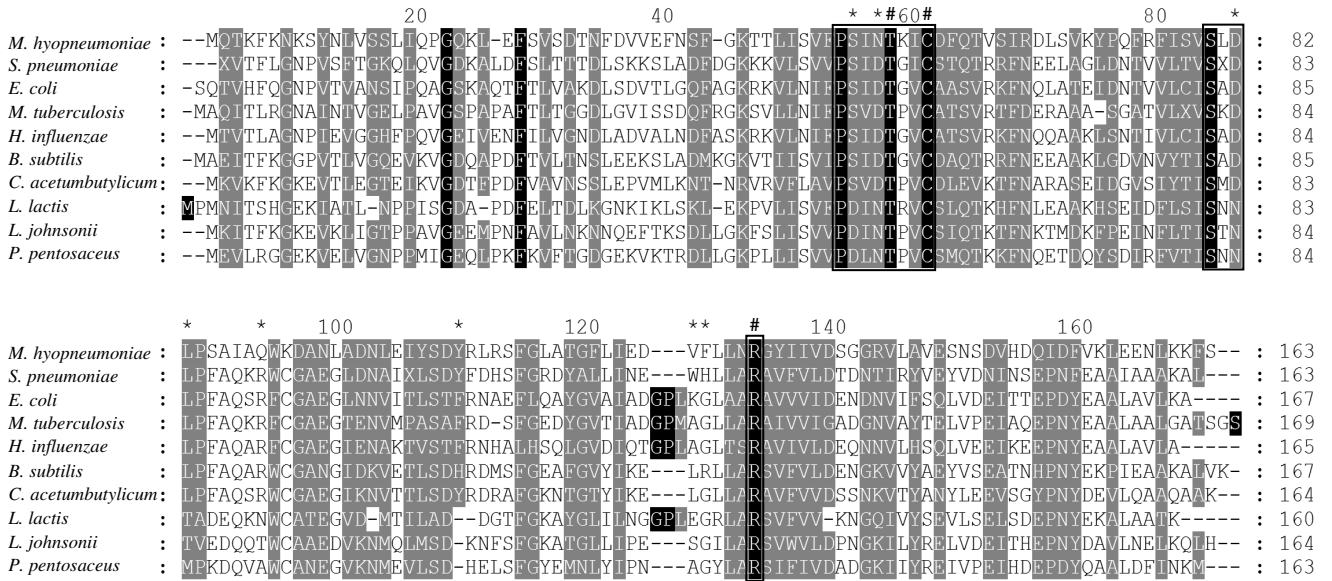
The generated murine anti-MhPrx serum was used in western blot experiments to probe protein extracts of three different *M. hyopneumoniae* strains (J, 7422 and 7448). As shown in Fig. S1, a band between 15 and 20 kDa, in agreement with the expected molecular mass of the monomeric form of MhPrx (18.5 kDa), was detected in all strains, but is absent in replicate membranes probed with the pre-immune serum.



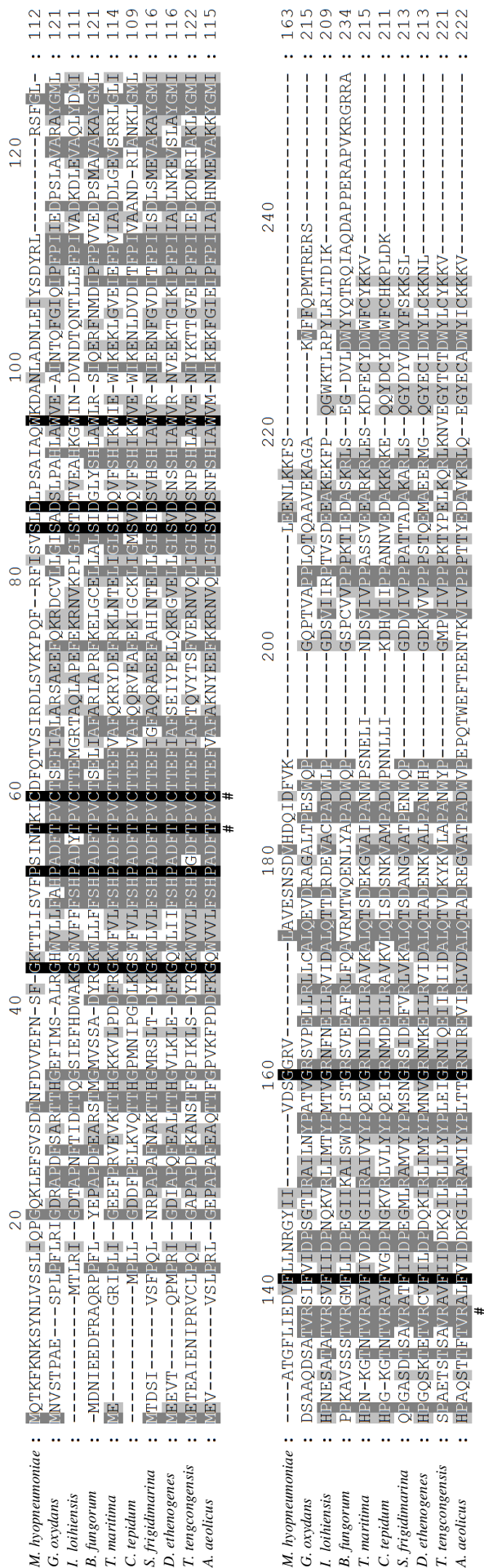
**Fig. S1. Detection of MhPrx expression in protein extracts from different *M. hyopneumoniae* strains.** Eighty micrograms of protein extract from three *M. hyopneumoniae* strains (J, 7422 and 7448) were fractionated in 15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Anti-MhPrx antiserum (a) or pre-immune serum (b), both at a dilution of 1:2000, were used as primary antibodies. A peroxidase-labelled anti-mouse IgG conjugate was used at a dilution of 1:5000. Purified rMhPrx (rMhPrx) was included in the analyses as a positive control. The arrow points to the 18.5 kDa bands corresponding to MhPrx (in the J, 7422 and 7448 samples) and rMhPrx (in the control sample). Molecular masses of the pre-stained standards (M) are indicated.

## Sequence analysis of MhPrx

MhPrx was regarded as a 1-Cys peroxiredoxin, since it has a single cysteine residue. However, despite lacking a second cysteine residue (the so-called resolving cysteine), a BLAST search against the NCBI databases using the MhPrx deduced amino acid sequence as query sequence (data not shown) returned specific hits and detected putative conserved domains only with the atypical 2-Cys peroxiredoxin subfamily, with no significant similarity to 1-Cys peroxiredoxin subfamily members. Sequence alignment of MhPrx and nine bacterial atypical 2-Cys peroxiredoxins (Fig. 3) revealed that the *M. hyopneumoniae* enzyme presents conserved amino acid residues with these proteins throughout its sequence, with overall identities and similarities ranging between 18% and 33%, and 36% and 51%, respectively. The catalytic triad is 100% conserved and five out of eight residues of the putative dimerization domain are conserved (considering their physiochemical properties), whereas the other three residues do not show similarity with the subfamily members, although they are less conserved. MhPrx sequence was also aligned with nine bacterial 1-Cys peroxiredoxins (Fig. S2), showing low overall scores of similarity and identity (in the range from 3% to 9% and from 24% to 27%, respectively). As expected, given that part of the catalytic mechanism is shared by all peroxiredoxins, there is some conservation in residues of the active site.



**Fig. 3. Multiple sequence alignment of MhPrx and bacterial members of the atypical 2-Cys peroxiredoxin subfamily:** Nine members of the subfamily are depicted in the figure with MhPrx. Identical and similar amino acids (considering their physicochemical properties) are denoted by black and grey backgrounds, respectively. Black rectangles point to residues spatially related to the catalytic site, including the peroxidatic cysteine at position 57 in MhPrx. Residues comprising the catalytic triad (#) and the putative dimer interface (\*) are indicated. Organisms from which sequences were taken (and sequence accession numbers) are: *Streptococcus pneumoniae* (YP\_816920), *Escherichia coli* (NP\_287864), *Mycobacterium tuberculosis* (1XVQ A), *Haemophilus influenzae* (NP\_438910), *Bacillus subtilis* (NP\_390827), *Clostridium acetobutylicum* (NP\_349898), *Lactococcus lactis* (NP\_266460), *Lactococcus johnsonii* (NP\_965009) and *Pediococcus pentosaceus* (YP\_804775).



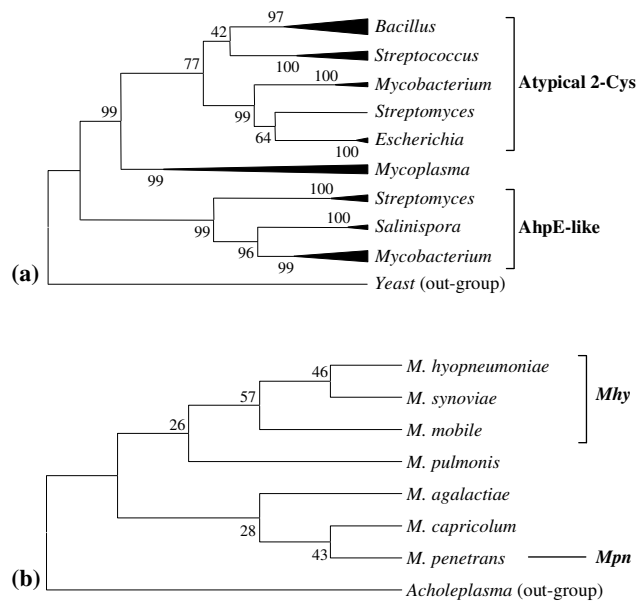
**Fig. S2. Multiple sequence alignment of MhPrx and bacterial members of the 1-Cys peroxiredoxin subfamily:** Nine members of the subfamily are depicted in the figure with MhPrx. Backgrounds denote amino acid residues shared by 4-6 (light grey), 7-9 (dark grey) or all the 10 (black) peroxiredoxins. Residues (T, C and R) comprising the catalytic triad in the 1-Cys subfamily are indicated by #. Organisms from which sequences were taken (and sequence accession numbers) are: *Gluconobacter oxydans* (YP\_191008), *Idiomarina loihensis* (YP\_156723), *Burkholderia fungorum* (ZP\_00280897), *Thermotoga maritima* (Q9WZR4), *Chlorobium tepidum* (NP\_662627), *Shewanella frigidimarina* (ZP\_00639651), *Dehalococcoides ethenogenes* (YP\_182278), *Thermoanaerobacter tengcongensis* (NP\_623740) and *Aquifex aeolicus* (O67024).

### Phylogenetic analysis of MhPrx

To further investigate the evolutive relationships of mycoplasmal peroxiredoxins with other bacterial orthologs, a phylogenetic tree was constructed. MhPrx and other three mycoplasmal peroxiredoxins (from *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma mobile* and *Mycoplasma pulmonis*) were aligned to known atypical 2-Cys or AhpE-like peroxiredoxins from 25 bacterial species, with the atypical 2-Cys peroxiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae*, Dot5p, as an out-group (Fig. 4a). Atypical 2-Cys and AhpE-like peroxiredoxins grouped separately, as expected, supported by a bootstrap value of 99%. MhPrx, together with the other mycoplasmal peroxiredoxins, grouped with the known atypical 2-Cys clade rather than with AhpE-like clade.

An additional analysis was conducted within the *Mycoplasma* clade using peroxiredoxins from seven different species (the four previously used plus those of *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma penetrans*), with the *Acholeplasma laidlawii* peroxiredoxin as out-group (Fig. 4b). This analysis divided *Mycoplasma* species in two groups (one containing *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae*, *M. mobile* and *M. pulmonis*, and the other one containing *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. penetrans*) and showed that the closest sequence to MhPrx is that from *M. synoviae* peroxiredoxin.





**Fig. 4. MhPrx phylogenetic relationships:** (a) Neighbour-joining tree of aligned peroxiredoxins of four *Mycoplasma* species (*M. hyopneumoniae*, *M. synoviae*, *M. mobile* and *M. pulmonis*) and other 25 bacterial species from six genera and *Saccharomyces cerevisiae* Dot5p (atypical 2-Cys peroxiredoxin, accession number NP\_012255) as an out-group. Organisms from which sequences were taken (and sequence accession numbers) are: Atypical 2-Cys: *Bacillus*: *B. licheniformis* (YP\_080231), *B. pumilus* (ZP\_03055981), *B. amyloliquefaciens* (YP\_001422231), *B. cereus* (ZP\_03108109), *B. thuringiensis* (ZP\_00740038), *B. selenitireducens* (ZP\_02170589), *B. clausii* (YP\_176238); *Streptococcus*: *S. agalactiae* (NP\_688140), *S. pneumoniae* (ZP\_01408570), *S. gordonii* (YP\_001451072); *Mycobacterium*: *M. tuberculosis* (1XVQ A), *M. ulcerans* (YP\_906643); *Streptomyces clavuligerus* (ZP\_03181049); *Escherichia*: *E. albertii* (ZP\_02903301), *E. coli* (NP\_287864). AhpE-like: *Streptomyces*: *S. svicens* (YP\_002203881), *S. coelicolor* (NP\_626616), *S. griseus* (YP\_001826644); *Salinispora*: *S. arenicola* (YP\_001538397), *S. tropica* (YP\_001160179); *Mycobacterium*: *M. vanbaalenii* (YP\_954537), *M. gilvum* (YP\_001134049), *M. avium* (NP\_960925), *M. tuberculosis* (1XVW A), *M. ulcerans* (YP\_905342). (b) Neighbour-joining tree of seven aligned peroxiredoxins from the *Mycoplasma* clade with the peroxiredoxin of *Acholeplasma laidlawii*, one of the first mollicutes to evolve by genome reduction (Razin *et al.*, 1998; Sirand-Pugnet *et al.*, 2007), as an out-group. Species representing the *Mhy* and *Mpn* clusters, defined by Oshima & Nishida (2007), are indicated. Organisms from which sequences were taken (and sequence accession numbers) are: *M. hyopneumoniae* (YP\_287496), *M. synoviae* (YP\_278491), *M. mobile* (YP\_015976), *M. pulmonis* (NP\_326539), *M. agalactiae* (YP\_001256344), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (YP\_424787), *M. penetrans* (NP\_757783), *Acholeplasma laidlawii* (YP\_001620344). Bootstrap test values (1000 replicates) are shown.

## Discussion

In the present study we demonstrated that MhPrx has a DNA-protecting peroxidase activity and that it is expressed in both non-pathogenic (J) and pathogenic (7422 and 7448) *M. hyopneumoniae* strains. Swine can generate ROS by means of both its immune response and as byproducts of respiration, being H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> commonly present in the host environment (du Manoir *et al.*, 2002). It has also been demonstrated that mycoplasmas themselves produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as byproducts of the glycerol metabolism, being this toxic metabolite involved in virulence in species like *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma pneumoniae* (Bischof *et al.*, 2008, Hames *et al.*, 2009). Moreover, despite of the absence of a known gene coding for SOD in its genome (Vasconcelos *et al.*, 2005), a Cu/ZnSOD activity has been demonstrated in *M. hyopneumoniae* (Chen *et al.*, 2000), catalyzing the dismutation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and contributing to the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MhPrx is the only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzyme identified in *M. hyopneumoniae* so far, and it is expected to play a major role in detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultant from all the mentioned sources.

Our *in vitro* results with rMhPrx indicate that it exists in part as a dimer. Given its similarity to members of the atypical 2-Cys peroxiredoxin subfamily, it is probable that MhPrx native form is actually a dimer. It has been established that atypical 2-Cys peroxiredoxins are active as dimers and eight amino acid residues are proposed to form the dimer interface in this subfamily members (Choi *et al.*, 2003, Wood *et al.*, 2003, Rho *et al.*, 2006). In MhPrx, there is a partial conservation of the putative dimer interface, and homodimerization probably involves these amino acid residues.

The MCO system has been largely used to assess ROS damage to DNA and other biomolecules such as protein and lipids (Rho *et al.*, 2006; Pushpamali *et al.*, 2008;

Suttiprapa *et al.*, 2008) and has been previously used to assay the activity of peroxiredoxins from different subfamilies (Li *et al.*, 2004; Rho *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). The Fe<sup>3+</sup> present in the MCO system reacts with O<sub>2</sub> generating the intermediate product H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ultimately hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>) that can nick supercoiled plasmid DNA into a linear form. Our results using the MCO system showed that MhPrx has a peroxidase activity acting over the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intermediate and protecting plasmid DNA from nicking. Despite the apparent difference between the treatments with 7.5 μM and 3.75 μM MhPrx, there was no significant difference using the Tukey's Multiple Comparison Tests post hoc analysis. However, the use of other ANOVA post hoc less stringent tests resulted in significant difference between the two treatments (data not shown), and this lack of a dose-dependence in our experiments is likely to be a consequence of the stringency of the Tukey's Multiple Comparison Tests.

During the peroxiredoxins catalytic cycle, the peroxidatic cysteine is first oxidized to a sulfenic acid and is reduced in a second step. Assignment of enzyme names depends on the nature of the reducing agent. In the MCO system assay, the reducing agent (DTT) is artificial and, therefore, the MhPrx natural reducing agent remains to be identified. MhPrx was originally described as a thiol peroxidase (Vasconcelos *et al.*, 2005), but, since its mechanism of action was not fully elucidated and at least some 1-Cys peroxiredoxins can use non-thiolic electron donors to reduce the peroxidatic cysteine sulfenic acid intermediate (Monteiro *et al.*, 2007a), we decided to treat this enzyme generically as a peroxiredoxin.

MhPrx expression in *M. hyopneumoniae* 7448 has been previously reported based on proteomic studies (Pinto *et al.*, 2007), where it appears as a strong spot even in Coomassie Blue stained 2D SDS-PAGE. Here, we demonstrate that MhPrx is also

expressed in the J and 7422 strains, in accordance with our unpublished proteomic results (Pinto *et al.*, manuscript in preparation). Microarray-based global transcription analyses have not detected any changes in the expression level of the *tpx* gene in the *M. hyopneumoniae* 232 after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schafer *et al.*, 2007). Thus, the expression of MhPrx in three different strains even under culture conditions may suggest additional roles for this protein in the *M. hyopneumoniae* biology, resulting in a constitutive mode of expression. Another possible explanation would be the expression of MhPrx in response to endogenous oxidative stress, which is supported by the presence of genes (such as *glpD*) that participate in ROS-generating metabolic pathways in this bacterium. High levels of expression of peroxiredoxins have also been reported for *E. coli*, where they are among the ten most expressed proteins (Link *et al.*, 1997) and for mammalian cells, in which peroxiredoxins represent 0.1-0.8% of soluble proteins (Seo *et al.*, 2000) under standard culture conditions and not only under induced oxidative stress.

Peroxiredoxin classification was originally proposed based on the number of cysteines residues present in the protein sequence involved in the enzymatic mechanism and in the conservation of residues around the catalytic cysteines (Rhee *et al.*, 2005). According to this classification, peroxiredoxins can be divided into two subfamilies, the 1-Cys and the 2-Cys. The 2-Cys peroxiredoxins are further divided into typical or atypical based on the formation of an intermolecular or an intramolecular disulfide bond in the catalytic cycle, respectively. In our phylogenetic analysis, MhPrx grouped, along with the other three mycoplasmal peroxiredoxins (from *M. synoviae*, *M. mobile* and *M. pulmonis*) within the atypical 2-Cys subfamily. Accordingly, *M. mobile* and *M. pulmonis*, have two cysteines in their amino acid sequences matching the conserved peroxidatic and resolving cysteines present in atypical 2-Cys peroxiredoxins. *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp.

*capricolum* and *M. penetrans* peroxiredoxins were excluded of this first analysis because they did not group within any clade, but they also have two cysteines in their sequences. However, *M. hyopneumoniae* and *M. synoviae* peroxiredoxins have only the peroxidatic cysteine, lacking the resolving cysteine. A 1-Cys peroxiredoxin with structure and sequence showing more similarity to 2-Cys peroxiredoxins was reported in *Mycobacterium tuberculosis* (AhpE) (Li *et al.*, 2005) and a number of orthologs found in other organisms (Stinear *et al.*, 2007; Ohnishi *et al.*, 2008) have been grouped with it into a new subfamily, namely AhpE-like. However, in our phylogenetic tree, mycoplasmal peroxiredoxins did not group with the AhpE-like peroxiredoxins, being more closely related to atypical 2-Cys subfamily members.

*M. hyopneumoniae* and *M. synoviae*, along with *M. mobile* and *M. pulmonis*, are members of the *M. hyopneumoniae* (*Mhy*) group, as proposed by whole genome sequence analysis (Oshima & Nishida, 2007). On the other hand, *M. penetrans* is proposed to be a member of the *M. pneumoniae* (*Mpn*) group, whereas *M. agalactiae* and *M. capricolum* subsp. *capricolum* were excluded from the abovementioned analysis. Despite of its low bootstrap values, our mycoplasmal peroxiredoxin phylogenetic tree presented an overall arrangement that agrees with the classification described by Oshima & Nishida (2007), separating *M. penetrans* (*Mpn* group) from the *Mhy* group. Altogether, these data suggest that, within the *Mhy* group, as in *M. hyopneumoniae* and *M. synoviae*, an atypical 2-Cys peroxiredoxin may have evolved to a 1-Cys peroxiredoxin by losing the resolving cysteine and keeping the peroxidatic cysteine. The resultant peroxiredoxin is still functional, as indicated by our rMhPrx *in vitro* assays, but its catalytic mechanism may differ from that of atypical 2-Cys peroxiredoxins and remains to be elucidated.

Further studies will be necessary to demonstrate MhPrx activity *in vivo* and to investigate its specific roles in *M. hyopneumoniae*. It is likely that its primary function would be the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whether generated endogenously or in the natural environment, and that its role would be essential for *M. hyopneumoniae* survival. This, associated with the considerable divergence of MhPrx and mammal peroxiredoxins, turns this enzyme into an attractive target to screen for inhibitors that could be used to drug developing against porcine enzootic pneumonia. Currently, there are no specific inhibitors of the peroxiredoxin family of enzymes, and they remain to be developed (Li *et al.*, 2004). Apart from being one of the few proteins related to ROS-protection identified in *M. hyopneumoniae* to date and the first one to be functionally characterized, MhPrx came out to be also extremely interesting from the evolutionary point of view. It is representative of a possible group of atypical 2-Cys peroxiredoxins which have lost the resolving cysteine residue without loosing their catalytic properties, and the future elucidation of its mechanism of action may help to better understand the evolution of the peroxiredoxin superfamily.

### **Acknowledgments**

We thank M.Sc. L. C. T. Silveira and R. X. Cortes for the help with the phylogenetic and statistical analyses, respectively. We also thank Dr. C. R. Carlini and Dr. D. Olivera-Severo for assistance with the FPLC system. C. X. M. was a recipient of CNPq M.Sc. fellowship. P.M.P. was a recipient of a CNPq predoctoral fellowship. This work was supported by grants from the Brazilian science funding agencies MCT/CNPq and FAPERGS.

## References

- Angelaccio, S. & Bonaccorsi di Patti, M. C. (2002).** Site-directed mutagenesis by the megaprimer PCR method: variations on a theme for simultaneous introduction of multiple mutations. *Anal Biochem* **306**, 346-349.
- Bischof, D. F., Janis, C., Vilei, E. M., Bertoni, G. & Frey, J. (2008).** Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun* **76**, 263-269.
- Bischof, D. F., Vilei, E. M. & Frey, J. (2009).** Functional and antigenic properties of GlpO from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: characterization of a flavin adenine dinucleotide-binding site deletion mutant. *Vet Res* **40**, 35.
- Bryk, R., Griffin, P. & Nathan, C. (2000).** Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**, 211-215.
- Castro, H., Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Lünsdorf, H., Wissing, J., Tomás, A. M. (2002).** Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* **33**, 1563-1574.
- Caruso, J. P. & Ross, R. F. (1990).** Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res* **51**, 227-231.
- Chen, J. R., Weng, C. N., Ho, T. Y., Cheng, I. C. & Lai, S. S. (2000).** Identification of the copper-zinc superoxide dismutase activity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **73**, 301-310.
- Cho, J. G., Dee, S. A., Deen, J., Guedes, A., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Collins, J. E. & other authors (2006).** Evaluation of the effects of animal age,

concurrent bacterial infection, and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus concentration in pigs. *Am J Vet Res* **67**, 489-493.

**Choi, J., Choi, S., Choi, J., Cha, M. K., Kim, I. H. & Shin, W. (2003).** Crystal structure of *Escherichia coli* thiol peroxidase in the oxidized state: insights into intramolecular disulfide formation and substrate binding in atypical 2-Cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* **278**, 49478-49486.

**Ciprian, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R. & de la Garza, M. (1988).** *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* **52**, 434-438.

**DeBey, M. C. & Ross, R. F. (1994).** Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* **62**, 5312-5318.

**du Manoir, J. M., Albright, B. N., Stevenson, G., Thompson, S. H., Mitchell, G. B., Clark, M. E. & Caswell, J. L. (2002).** Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. *Vet Immunol Immunopathol* **89**, 175-186.

**Hames, C., Halbedel, S., Hoppert, M., Frey, J. & Stulke, J. (2009).** Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **191**, 747-753.

**Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2001).** *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th edn. New York: Garland Science Publishing.

**Knoops, B., Loumaye, E. & Van Der Eecken, V. (2007).** Evolution of the peroxiredoxins. *Subcell Biochem* **44**, 27-40.



- Li, J., Zhang, W. B., Loukas, A., Lin, R. Y., Ito, A., Zhang, L. H., Jones, M. & McManus, D. P. (2004).** Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene* **326**, 157-165.
- Li, S., Peterson, N. A., Kim, M. Y., Kim, C. Y., Hung, L. W., Yu, M., Lakin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S. & Baker, E. N. (2005).** Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. *J Mol Biol* **346**, 1035-1046.
- Link, A. J., Robison, K. & Church, G. M. (1997).** Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**, 1259-1313.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M. & Haesebrouck, F. (2008).** Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* **126**, 297-309.
- Mare, C. J. & Switzer, W. P. (1965).** New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin* **60**, 841-846.
- Messier, S., Ross, R. F. & Paul, P. S. (1990).** Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* **51**, 52-58.
- Minion, F. C., Lefkowitz, E. J., Madsen, M. L., Cleary, B. J., Swartzell, S. M. & Mahairas, G. G. (2004).** The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* **186**, 7123-7133.
- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O. & Netto, L. E. (2007a).** Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 4886-4891.

- Monteiro, K. M., Scapin, S. M., Navarro, M. V., Zanchin, N. I., Cardoso, M. B., da Silveira, N. P., Goncalves, P. F., Stassen, H. K., Zaha, A. & Ferreira H. B. (2007b).** Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta* **1774**, 278-285.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. (2008).** Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**, 4050-4060.
- Oshima, K. & Nishida, H. (2007).** Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. *J Mol Evol* **65**, 249-258.
- Pilo, P., Vilei, E. M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M. H., Dobbelaere, D. & Frey, J. (2005).** A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* **187**, 6824-6831.
- Pinto, P. M., Chemale, G., de Castro, L. A., Costa, A. P., Kich, J. D., Vainstein, M. H., Zaha, A. & Ferreira, H. B. (2007).** Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol* **121**, 83-93.
- Pushpamali, W. A., de Zoysa, M., Kang, H. S., Oh, C. H., Whang, I., Kim, S. J. & Lee, J. (2008).** Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol* **24**, 294-307.
- Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y. (1998).** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1094-1156.

- Rhee, S. G., Chae, H. Z. & Kim, K. (2005).** Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* **38**, 1543-1552.
- Rho, B. S., Hung, L. W., Holton, J. M., Vigil, D., Kim, S. I., Park, M. S., Terwilliger, T. C. & Pedelacq, J. D. (2006).** Functional and structural characterization of a thiol peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* **361**, 850-863.
- Ross, R. F. (1992).** Mycoplasmal disease. In *Diseases of Swine*, pp. 535-549. Edited by B. E. Straw. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Schafer, E. R., Oneal, M. J., Madsen, M. L. & Minion, F. C. (2007).** Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology* **153**, 3785-3790.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H. & Rhee, S. G. (2000).** Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**, 20346-20354.
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barre, A. & Blanchard, A. (2007).** Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol* **158**, 754-766.
- Stinear, T. P., Seemann, T., Pidot, S., Frigui, W., Reysset, G., Garnier, T., Meurice, G., Simon, D., Bouchier, C., & other authors (2007).** Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* **17**, 192-200.
- Suttiaprapa, S., Loukas, A., Laha, T., Wongkham, S., Kaewkes, S., Gaze, S., Brindley, P. J. & Sripa, B. (2008).** Characterization of the antioxidant enzyme, thioredoxin peroxidase, from the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol Biochem Parasitol* **160**, 116-122.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- 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. & other authors (2005).** Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* **187**, 5568-5577.
- Vilei, E. M. & Frey, J. (2001).** Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 85-92.
- Wang, Q., Chen, K., Yao, Q., Zhao, Y., Li, Y., Shen, H. & Mu, R. (2008).** Identification and characterization of a novel 1-Cys peroxiredoxin from silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**, 176-182.
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin, H. J. & Poole, L. B. (2003).** Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**, 32-40.

### 3. Discussão final

No presente trabalho, foi demonstrado que a proteína MhPrx é expressa nas três cepas de *M. hyopneumoniae* analisadas e que a rMhPrx apresenta atividade peroxidática, demonstrada em função da proteção de DNA. Este fato, associado à ausência de ortólogos de genes que codificam outras proteínas envolvidas na detoxificação de ERO no genoma desta bactéria, prontamente destaca a MhPrx como um possível fator de virulência deste organismo. Segundo CASADEVALL & PIROFSKI (1999), a definição de “fator de virulência” não deve levar em conta apenas uma visão centrada no patógeno, mas sim a interação entre ele e o hospedeiro. De acordo com estes autores, um fator de virulência seria qualquer componente do patógeno que causa dano ao hospedeiro ou que seja essencial para a viabilidade de tal patógeno. Considerando que em suínos a resposta imunológica inespecífica envolve a produção de ERO, entre as quais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (du MANOIR *et al.*, 2002), é provável que a MhPrx esteja envolvida na detoxificação destes compostos nocivos e, dessa forma, contribuiria para a viabilidade de *M. hyopneumoniae* uma vez que este esteja estabelecido no suíno.

Estudos recentes utilizando abordagens proteômicas (PINTO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, submetido) e análise de diferenças transcricionais em situações de estresse induzido (MADSEN *et al.*, 2006; SCHAFER *et al.*, 2007; MADSEN *et al.*, 2008) permitiram a identificação de outros possíveis fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* e de proteínas antigênicas possivelmente relacionadas com a sua patogenicidade. Através dos primeiros estudos, particularmente, foi possível identificar a expressão de lipoproteínas, adesinas como a p76, a p97 e a p146 e a chaperona Hsp70, algumas delas sofrendo modificações pós-transcricionais. Em uma comparação quantitativa entre as cepas J, 7422 e 7448, pelo menos 67 *spots* protéicos, incluindo proteínas envolvidas em citoaderência, foram

encontradas como mais expressas nas cepas patogênicas do que na não-patogênica. Nos estudos transcricionais, também foi possível identificar algumas lipoproteínas, adesinas e proteínas de choque térmico sendo diferencialmente expressas nas situações de estresse induzido. Contudo, os mecanismos de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, bem como fatores de virulência específicos e sua regulação, são ainda pouco conhecidos (MADSEN *et al.*, 2008). A confirmação da MhPrx como um fator de virulência poderá contribuir, portanto, para a elucidação de mecanismos moleculares essenciais para a sobrevivência desta bactéria quando em contato com o hospedeiro.

A presença da MhPrx em todas as cepas de *M. hyopneumoniae* testadas, inclusive na não-patogênica (J), é um ponto que merece destaque. Cabe salientar que os experimentos aqui realizados utilizaram bactérias crescendo em meios de cultura padrão (FRISS, 1975), ou seja, um meio rico onde *M. hyopneumoniae* não teria necessariamente que expressar fatores de virulência para sobreviver. Entretanto, os sistemas de regulação da expressão gênica de micoplasmas não estão totalmente elucidados e alguns pontos diferem daqueles comumente encontrados em outras bactérias. Estes organismos, por exemplo, têm apenas um fator sigma identificado (CHANG *et al.*, 2008). O nível relativamente alto de expressão da MhPrx nas três cepas testadas, mesmo em condições de cultura-padrão, sugere que esta enzima pode estar sendo expressa de maneira constitutiva ou ter funções adicionais. Uma possibilidade seria a expressão da MhPrx em resposta ao estresse oxidativo endógeno, uma vez que *M. hyopneumoniae*, assim como qualquer organismo, apresenta rotas metabólicas que poderiam resultar na produção de ERO. Como exemplo de componente de uma destas rotas, pode-se citar a presença de um gene codificador de uma NADH-oxidase (VASCONCELOS *et al.*, 2005), capaz de gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir da oxidação de NADH.

Os experimentos aqui realizados não permitem afirmar se a forma nativa da MhPrx é um monômero ou se ela se encontra em forma de dímero *in vivo*. De acordo com WOOD *et al.* (2003), a forma ativa de peroxirredoxinas 2-Cys atípicas é dimérica, e oito resíduos de aminoácidos parecem formar uma interface de dimerização. A dependência da formação de dímero para a atividade das peroxirredoxinas 2-Cys atípicas não é tão evidente quanto para as peroxirredoxinas 2-Cys típicas, uma vez que apenas nestas últimas há a formação de uma ponte dissulfeto intermolecular ao longo do ciclo catalítico (ver Figura 1.2). Da mesma forma, as peroxirredoxinas 1-Cys não dependem da formação de uma ponte dissulfeto intermolecular, já que o agente redutor é externo. O fato de a MhPrx apresentar apenas uma cisteína na sua seqüência sugere que ela também não dependa da formação desta uma ponte dissulfeto intermolecular. Todavia, a MhPrx apresenta uma conservação parcial (cinco de oito resíduos de aminoácidos) da possível interface de dimerização das peroxirredoxinas 2-Cys atípicas (assinalados na Figura 4 do manuscrito). Devido à similaridade entre as peroxirredoxinas 2-Cys atípicas e a MhPrx, poder-se-ia imaginar que esta enzima também se encontra em forma de dímero quando ativa, embora não seja claro como (e se) esta característica está associada com a sua atividade.

Entre as peroxirredoxinas de *Mycoplasma* spp. analisadas, apenas aquelas de *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae* apresentam uma cisteína em sua seqüência, sendo que as enzimas das outras espécies têm duas cisteínas, correspondendo às cisteínas peroxidática e de resolução da subfamília 2-Cys atípica. Nas proteínas de *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae*, a posição da cisteína de resolução é ocupada por um resíduo de lisina (K; ver figura 4 do manuscrito). Quanto a este aspecto, é importante destacar que o códon que codifica a lisina nos genes de ambas as espécies (AAA) não é resultado apenas da variação de uma base nucleotídica, mas sim um códon totalmente diferente daquele que codifica a

cisteína (TGT) das peroxirredoxinas dos outros micoplasmas analisados. Geralmente, é mais comum um evento de troca de aminoácidos envolvendo apenas um nucleotídeo; após esta primeira mutação, os outros dois nucleotídeos estariam menos propensos a sofrer pressão seletiva, ficando livres para mutar (GRIFFITHS *et al.*, 2001). É pouco provável, portanto, que dois eventos evolutivos independentes tenham gerado este novo códon em *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae*, pois aparentemente não há pressão seletiva para que o códon AAA seja mantido ao longo do tempo. Assim, é cabível se cogitar que esta troca de códon tenha ocorrido em um ancestral comum a *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae*.

Em uma comparação com o que já está descrito na literatura, árvores filogenéticas geradas a partir de rDNA 16S (SIRAND-PUGNET *et al.*, 2007a) ou de seqüência genômica total (OSHIMA & NISHIDA, 2007) agrupam *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae* em um mesmo grupo [hominis, conforme SIRAND-PUGNET (2007a), ou *Mhy*, conforme OSHIMA & NISHIDA (2007)]. No entanto, estas duas classificações diferem no que diz respeito à distância entre estas duas espécies. Na árvore filogenética gerada a partir de rDNA 16S, *M. hyopneumoniae* fica mais próximo de *M. pulmonis* do que de *M. synoviae*, enquanto na análise utilizando seqüência genômica total, *M. synoviae* fica mais próximo de *M. pulmonis* e *M. mobile*, em vez de agrupar-se diretamente com *M. hyopneumoniae*. Para sustentar a idéia de que as peroxirredoxinas de *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae* tenham realmente surgido de um ancestral em comum, sem admitir o surgimento do códon AAA por eventos evolutivos independentes, estas duas espécies deveriam ficar agrupadas entre si, em vez de agruparem com espécies de micoplasmas que têm peroxirredoxinas contendo dois resíduos de cisteína.

Segundo RAZIN *et al.* (1998), é consensual entre taxonomistas de bactérias que seqüências genômicas completas são a melhor base para a filogenia e, por fim, para a



taxonomia. Na análise feita por OSHIMA & NISHIDA (2007), foram utilizadas como base para comparação entre espécies as seqüências de 143 proteínas, totalizando 43.370 posições de aminoácidos. É pertinente ressaltar, no entanto, que nesta análise não há pesos diferentes para cada posição de resíduo de aminoácido, levando em conta cada uma delas de forma igual. Poder-se-ia especular que, em um exame mais aprofundado, atribuindo valores mais elevados para as posições de resíduos mais conservados (como por exemplo, de domínios específicos de cada classe de proteínas ou de sítios catalíticos) seriam geradas árvores ilustrando relações filogenéticas diferentes daquelas obtidas neste estudo. No caso das peroxirredoxinas de micoplasmas, uma análise mais criteriosa, atribuindo valores maiores para as posições dos resíduos AAA (para a MhPrx), e principalmente considerando a conservação da cisteína de resolução nas espécies outras que *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae*, poderia vir a agrupar estas duas espécies. No entanto, somente uma análise a partir de um número maior de proteínas e utilizando estes critérios poderia estabelecer as relações filogenéticas deste grupo com maior confiança.

Através da análise da seqüência genômica de *M. hyopneumoniae*, outros três genes possivelmente envolvidos na detoxificação de ERO foram identificados (VASCONCELOS *et al.* 2005). Estes genes codificam as enzimas metionina-sulfóxido-redutase, tiorredoxina e tiorredoxina-redutase. A metionina-sulfóxido-redutase tem função de reparar metioninas oxidadas em proteínas danificadas por ação de ERO. A tiorredoxina e a tiorredoxina-redutase participam do ciclo catalítico de proteínas que se oxidam para neutralizar ERO, como é o próprio caso de algumas peroxirredoxinas (WOOD *et al.*, 2003). A partir de elétrons retirados de um agente redutor (geralmente, NADPH), a tiorredoxina-redutase reduz a tiorredoxina e esta última faz a redução dos intermediários oxidados destas proteínas antioxidantes. PINTO *et al.* (2007) já demonstraram a expressão tanto da

metionina-sulfóxido-redutase quanto de tiorredoxina em *M. hyopneumoniae* 7448. É provável, portanto, que estas duas proteínas estejam também envolvidas na proteção de *M. hyopneumoniae* contra os efeitos nocivos de ERO.

No caso das peroxirredoxinas 1-Cys, o sistema formado por tiorredoxina e tiorredoxina-redutase geralmente não é responsável pela redução do intermediário oxidado da enzima. Contudo, partindo do princípio que a MhPrx evoluiu a partir de uma peroxirredoxina 2-Cys atípica (que, em geral, usa o sistema tiorredoxina/tiorredoxina-redutase), através da perda de uma cisteína, é possível cogitar que talvez este sistema tenha um papel no ciclo catalítico desta proteína. Por outro lado, recentemente MONTEIRO *et al.* (2007) demonstraram que, pelo menos para algumas peroxirredoxinas 1-Cys, o agente redutor pode ser não-tiólico. Neste estudo, foi provado que o ascorbato também é capaz de reduzir certas peroxirredoxinas 1-Cys de diferentes organismos. Se este for o caso da MhPrx, a nomenclatura “tiol-peroxidase”, originalmente adotada quando da anotação do genoma (VASCONCELOS *et al.*, 2005), não faria sentido para esta proteína, uma vez que, apesar de apresentar atividade peroxidática, a redução do seu intermediário oxidado não dependeria de um agente redutor tiólico. Por este motivo, foi adotada a nomenclatura genérica de “peroxirredoxina” para tratar desta proteína ao longo deste trabalho.

Além de ser uma proteína com atividade relevante para *M. hyopneumoniae*, a MhPrx se mostrou interessante do ponto de vista evolutivo da superfamília das peroxirredoxinas. A continuidade de seu estudo deve agregar conhecimento tanto em relação pato-fisiologia deste organismo quanto no entendimento da evolução desta superfamília.

#### 4. Conclusões e perspectivas

A MhPrx é uma proteína particularmente interessante por ser uma das poucas enzimas identificadas em *M. hyopneumoniae* possivelmente envolvidas no sistema de detoxificação de ERO e a primeira a ser funcionalmente caracterizada. Apesar da ausência de comprovação da atividade peroxidática *in vivo*, parece claro que a ela deva estar atuando na proteção de *M. hyopneumoniae* contra ERO produzidas pelo suíno no processo de infecção. Se isto se confirmar e esta enzima se mostrar realmente como um importante fator de virulência, ela poderá ser utilizada como um alvo para tratamento terapêutico visando ao controle da PMS. Além do interesse nesta proteína de um ponto de vista funcional deste organismo, a MhPrx se mostrou diferenciada também por ser possivelmente representante de um grupo de peroxirredoxinas 2-Cys atípicas que perdeu a cisteína de resolução e que não havia sido descrito antes. Estudos futuros devem contribuir para o entendimento de seu papel em *M. hyopneumoniae* e também no entendimento da evolução da superfamília das peroxirredoxinas. Como etapas imediatas de estudo, podem ser citadas:

- a) teste de atividade da MhPrx *in vivo* durante infecção de *M. hyopneumoniae*;
- b) busca de inibidores específicos para MhPrx visando ao desenvolvimento de drogas para o controle da PMS;
- c) verificação da interação com as proteínas tiorredoxina, tiorredoxina-redutase e metionina-sulfóxido-redutase, possivelmente relacionadas com proteção contra ERO;
- d) caracterização dos passos do ciclo catalítico da MhPrx (determinação do agente redutor natural e formação de dímero da rMhPrx) bem como de um mutante contendo as cisteínas catalítica e de resolução para examinar sua relação com a superfamília da peroxirredoxinas.

## 5. Referências bibliográficas citadas nas seções 1 e 3

1. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Garland Science Publishing, 2002.
2. BOVE, J. M. Molecular features of mollicutes. *Clinical Infectious Diseases*, 17(1): S10-31, 1993.
3. BRYK, R.; GRIFFIN, P. & NATHAN, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, 407(6801): 211-15, 2000.
4. CARUSO, J. P. & ROSS, R. F. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 51(2): 227-231, 1990.
5. CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8): 3703-13, 1999.
6. CASTRO, H.; BUDDE, H.; FLOHE, L.; HOFMANN, B.; LUNSDORF, H., WISSING, J. & THOMAS, A. L. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 1563-74, 2002.
7. CHA, M. K.; KIM, H. K. & KIM, I. H. Thioredoxin-linked “Thiol Peroxidase” from Periplasmic Space of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(48): 28635-41, 1995.
8. CHAE, H. Z.; ROBISON, K.; POOLE, L. B.; CHURCH, G.; STORZ, G. & RHEE, S. G. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15): 7017–21, 1994.
9. CHAMBAUD, I.; HEILIG, R.; FERRIS, S.; BARBE, V.; SAMSON, D.; GALISSON, F.; MOSZER, I.; DYBVIG, K.; WROBLEWSKI, H.; VIARI, A.; ROCHA, E. P. & BLANCHARD, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Research*, 29(10): 2145-53, 2001.
10. CHANG, L. J.; CHEN, W. H.; MINION, F. C. & SHIUAN, D. Mycoplasmas regulate the expression of heat-shock protein genes through CIRCE–HrcA interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1): 213-218, 2008.

11. CHO, J. G.; DEE, S. A.; DEEN, J.; GUEDES, A.; TRINCADO, C.; FANO, E.; JIANG, Y.; FAABERG, K.; COLLINS, J.E.; MURTAUGH, M.P. & JOO, H.S. Evaluation of the effects of animal age, concurrent bacterial infection, and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus concentration in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 67(3): 489-93, 2006.
12. CIPRIÁN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TÓRTORA, J.; COLMENARES, G.; LÓPEZ-REVILLA, R. & DE LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* Increases the Susceptibility of Pigs to Experimental *Pasteurella multocida* Pneumonia. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(4): 434-38, 1988.
13. CURNUTTE J. T.; BABIOR, B. M. Chronic granulomatous disease. *Advances in Human Genetics*, 16: 229-45, 1987.
14. DeBEY, M. C. & ROSS, R. F. Ciliostasis and Loss of Cilia Induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in Porcine Tracheal Organ Cultures. *Infection and Immunity*, 62(12): 5312-18, 1994.
15. du MANOIR, J. M.; ALBRIGHT, B. N.; STEVENSON, G.; THOMPSON, S. H.; MITCHELL, G. B.; CLARK, M. E. & CASWELLJ. L. Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89(3-4): 175-186, 2002.
16. FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R.D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K.V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT K., F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A. 3<sup>rd</sup> & VENTER, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270(5235): 397-403, 1995.
17. FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk Veterinary Medicine*, 27(6): 337-339, 1975.
18. GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; KUBY, J. & OSBORNE B. A. *Immunology*. 5<sup>a</sup> ed. W H Freeman & Co., 2003.
19. GREST, P.; KELLER, H.; SYDLER, T. & POSPISCHIL, A. The prevalence of lung lesions in pigs at slaughter in Switzerland. Proc. 15<sup>th</sup> IPVS, Birmingham, p. 330, 1998.
20. GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H. & LEWONTIN, R. C. *Genética Moderna*. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2001.

21. GUERRERO, R. Respiratory disease: An important global problem in the swine industry. Proc. 11<sup>th</sup> IPVS, Lousiane, p. 98, 1990.
22. 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*, 24(22): 4420–49, 1996.
23. HOFMANN, B.; HECHT, H. J. & FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. *Biological Chemistry*, 383(3-4): 347-364, 2002.
24. HSU, F. & FANG, W. An abattoir survey of the incidence of pneumonia in swine in Taiwan. Proc. 11<sup>th</sup> IPVS, Lousiane, p. 108, 1990.
25. 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*, 14(8):1447-61, 2004.
26. JANEWAY Jr., C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. & SHLOMCHIK M. J. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5<sup>a</sup> ed. Garland Publishing, 2001.
27. KICH, J. P. & PONTES, A. P. Análise da situação atual das doenças respiratórias no Brasil. In: X CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Porto Alegre. Anais do X congresso da ABRAVES, p. 58-67, 2001.
28. KIKUCHI, Y.; OHARA, N.; SATO, K.; YOSHIMURA, M.; YUKITAKE, H.; SAKAI, E.; SHOJI, M.; NAITO, M. & NAKAYAMA, K. Novel stationary-phase-upregulated protein of *Porphyromonas gingivalis* influences production of superoxide dismutase, thiol peroxidase and thioredoxin. *Microbiology*, 151(Pt 3): 841-53, 2005.
29. KIM, K.; KIM, I.; LEE, K.Y.; RHEE, S.G. & STADTMAN, E.R. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(10): 4704–4711, 1988.
30. KNOOPS, B.; LOUMAYE, E. & VAN DER EECKEN, V. Evolution of the peroxiredoxins. *Subcellular Biochemistry*, 44: 27-40, 2007
31. LINK, A. J.; ROBISON, K. & CHURCH, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis*, 18(8): 1259–1313, 1997.

32. LUNDEHEIN, N.; RABE, J.; KARLSSON, G.; ROBERTSSON, J. & WIERUP, M. National data bank on lesions recorded at slaughter-na integrated part of a health control program for slaughter pig production in Sweden. Proc. 15<sup>th</sup> IPVS, Birmingham, p. 101, 1998.
33. MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L. EDWARDS, R. & MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infection and Immunity*, 74(1): 160-6, 2006.
34. MADSEN, M. L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E. L.; CARRUTHERS, M. D. & MINION, F. C. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infection and Immunity*, 76(2): 658-63, 2008.
35. MARE, C. J. & SWITZER, W. P. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. *Veterinary medicine, small animal clinician*, 60: 841-46, 1965.
36. MARTELLI, P.; POZZI, P.; KAMPHUISEN, K.; BISCONTINI, G.; QUINTAVALLA, C. & GUADAGNINI, P. The prevalence of lungs lesions in pigs at slaughter-houses in northern Italy. Proc. 15<sup>th</sup> IPVS, Birmingham, p. 331, 1998.
37. McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22): 6049-55, 1969.
38. 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*, 186(21): 7123-33, 2004.
39. MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E. & LODGE, J. K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 51(5): 1447-58, 2004.
40. MONTEIRO, G.; HORTA, B. B.; PIMENTA, D. C.; AUGUSTO, O. & NETTO, L. E. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 4886-91, 2007.
41. NATHAN, C. & SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16): 8841-48, 2000.
42. OSHIMA, K. & NISHIDA, H. Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. *Journal of Molecular Evolution*, 65: 249-58, 2007.

43. PAPAIZISI, 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 R<sub>low</sub>. *Microbiology*, 149: 2307–16, 2003.
44. PINTO, P. M.; CHEMALE, G.; de CASTRO, L. A.; COSTA, A. P.; KICH, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Veterinary Microbiology*, 121: 83-93, 2007.
45. PINTO, P. M.; KLEIN, K. S.; ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. Comparative proteomics analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. (manuscrito submetido).
46. PITCHER, D. G. & NICHOLAS, R. A. J. *Mycoplasma* host specificity: Fact or fiction? *The Veterinary Journal*, 170: 300–06, 2005.
47. PROSPERI, M. T.; FERBUS, D.; KARZINSKI, I. & GOUBIN, G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(15): 11050–11056, 1993.
48. RAZIN, S. Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, 79(1-3): 423-31, 1992.
49. RAZIN, S.; YOGEV, D. & NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4): 1094–156, 1998.
50. ROSS, R. F. Mycoplasmal disease. In *Diseases of Swine*, pp. 535-549. Edited by B. E. Straw. Ames, IA: Iowa State University Press, 1992.
51. ROSTAGNO, M.; REIS, R.; NASCIMENTO, E. & SANTOS, J. Estudo de associação entre as doenças respiratórias em suínos, através do monitoramento de lesões ao abate. In: IX CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Belo Horizonte. Anais do IX congresso da ABRAVES, p.167- 168, 1999.
52. 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*, 30(23): 5293-300, 2002.
53. SCHAFER, E. R.; ONEAL, M. J.; MADSEN, M. L. & MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 153: 3785-90, 2007.



54. SEO, M. S.; KANG, S. W.; KIM, K.; BAINES, I. C.; LEE, T. H. & RHEE, S. G. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27): 20346–20354, 2000.
55. SILVA, A.; PAGANINI, F.; ACOSTA, J.; ROCHA, P.; MISTURA, H.; MARCON, E.; SIMON, V. & CASAGRANDE, H. Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I - Estudo do perfil das doenças respiratórias nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil. In: X CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Porto Alegre. Anais do X congresso da ABRAVES, p.31-32, 2001.
56. SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MARENDA, M.; JACOB, D.; BARRÉ, A.; BARBE, V.; SCHENOWITZ, C.; MANGENOT, S.; COULOUX, A.; SEGURENS, B.; de DARUVAR, A.; BLANCHARD, A.; CITTI, C. Being Pathogenic, Plastic, and Sexual while Living with a Nearly Minimal Bacterial Genome. *PLoS Genetics*, 3(5): e75, 2007a.
57. SIRAND-PUGNET, P.; CITTI, C.; BARRÉ, A.; BLANCHARD, A.; Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158(10): 754-766, 2007b.
58. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. J.; MORENO, A. M. & ROEHE, P. M. *Clínica e Patologia Suína*. 2<sup>a</sup> ed. Goiânia: Art 3 Impresses Especiais, p. 358-362, 1999.
59. SOBESTIANSKY, J.; DALLA COSTA, O.; MORES, N.; BARIONI, W. J. R.; PIFFER, I. & PEDROSO-DE-PAIVA, D. Estudos ecopatológicos nas fases de crescimento e terminação: prevalência de rinite atrofica e de pneumonia nas fases de crescimento e terminação na região sul do Brasil. In: IX CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Belo Horizonte. Anais do IX congresso da ABRAVES, p.171- 172, 1999.
60. TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; BERNARDES, V. V.; MARANHÃO, A. Q.; KYAW, C. M.; POCAS-FONSECA, M. & SILVA-PEREIRA, I. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genetics and Molecular Research*, 4(2): 372-89, 2005.
61. 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.; de MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R. G.; CUNHA, C. W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; 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*, 187(16): 5568-77, 2005.

62. WANG, G.; OLCZAK, A. A.; WALTON, J. P. & MAIER, R. J. Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infection and Immunity*, 73(1): 378-84, 2005.
63. 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*, 14(2): 221-27, 2004.
64. WOOD, Z. S.; SCHRÖDER, E.; ROBBIN HARRIS, J. & POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1): 32-40, 2003.
65. XAVIER, G. F. Controle da pneumonia em suínos. *Jornal da Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande (ACSURS)*. Dez, 2004.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

----- Original Message -----

Subject: Microbiology paper no. mic/2009/028266 – Submission acknowledgement  
Date: Thu, 12 Feb 2009 07:17:51 -0800 (PST)  
From: Stefan Sidorowicz [submit.mic@sgm.ac.uk](mailto:submit.mic@sgm.ac.uk)  
To: Henrique Bunselmeyer Ferreira [henrique@cbiot.ufrgs.br](mailto:henrique@cbiot.ufrgs.br)

Dear Dr Bunselmeyer Ferreira

Microbiology paper no. mic/2009/028266: A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification

Thank you for submitting your paper to Microbiology. It has been assigned the reference number shown above. Please quote this number in any correspondence.

Your paper is being considered for publication by Dr Christine Citti ("Christine Citti" <c.citti@envt.fr>), who will inform you of the decision in due course. Please contact Dr Citti with any queries about the progress of your paper until you receive the decision. If you are asked to revise the paper, please submit your revised manuscript via the Bench>Press system.

If your paper is accepted for publication, it is a condition of acceptance that you assign copyright to the Society for General Microbiology (the URL for the copyright assignment form will be sent to you at the appropriate stage).

We welcome the submission of striking pictures, preferably in colour, for possible use on the front cover of Microbiology. Pictures need not be linked with a paper in the journal. We will pay GBP75 towards expenses for any pictures used.

Yours sincerely

Mr Stefan Sidorowicz

-----  
Microbiology Editorial Office

Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK

Phone: +44 118 988 1800. Fax: +44 118 988 1834. [micro@sgm.ac.uk](mailto:micro@sgm.ac.uk)

<http://www.sgmjournals.org/>

<http://www.sgm.ac.uk/>

Society for General Microbiology. Registered as a Charity in England and Wales, no. 264017. A charity registered in Scotland, no. SC039250. Company Limited by Guarantee. Registered in England No. 1039582. Registered Office as above.

## APÊNDICE 2

### COMPROVAÇÃO DE ACEITE DO MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

----- Original Message -----

Subject: Microbiology paper no. mic/2009/030643 - Acceptance notification  
Date: Mon, 6 Jul 2009 06:13:16 -0700 (PDT)  
From: Christine Citti [c.citti@envt.fr](mailto:c.citti@envt.fr)  
To: Henrique B Ferreira [henrique@cbiot.ufrgs.br](mailto:henrique@cbiot.ufrgs.br)

Dear Dr Henrique B Ferreira

Microbiology paper mic/2009/030643: A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification

I am pleased to tell you that your paper is now acceptable for publication. Further processing of the paper will now be dealt with by the Microbiology Editorial Office, who will check that they have all the files needed for publication, and contact you if anything else is required.

Please note that when receiving the proof (or if sending the word text one more time), you should indicate in the text when it first appears what "MCO" is standing for. I could not find it in the text.

A signed copyright assignment form will be required before publication can proceed. Please download the copyright assignment form at <http://mic.sgmjournals.org/misc/cFORM.pdf> (you can use the link in the Author area of the manuscript tracking system), obtain the necessary signature(s), and return the form to the Editorial Office by mail or fax (address details are on the form), by e-mail to [micro@sgm.ac.uk](mailto:micro@sgm.ac.uk), or as a supplementary file upload via the manuscript tracking system. Please remember to include the paper number on the form.

#### IMPORTANT:

The journal has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless you inform the editorial office otherwise ([submit.mic@sgm.ac.uk](mailto:submit.mic@sgm.ac.uk)), they will assume that you agree to your manuscript being used in this way. The details you have entered into the Bench>Press site, such as the manuscript title, subject category and author details, and the PDF used for peer review will be used to generate the Papers in Press record.

Thank you for submitting your paper to Microbiology. I hope that you will consider the journal for publication of future papers.

Yours sincerely  
Dr Christine Citti  
Microbiology


## APÊNDICE 3

### *CURRICULUM VITAE RESUMIDO*

#### *Dados pessoais*

Nome Cláudio Xavier Machado  
Nome em citações bibliográficas MACHADO, C. X.  
Sexo Masculino  
Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.  
Av. Bento Gonçalves, 9500  
Agronomia  
91509-900 - Porto Alegre, RS - Brasil  
Telefone: (51) 33087769

#### *Formação acadêmica/Titulação*

2007 Mestrado em Biologia Celular e Molecular   
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.  
*Título: ., Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.*

2003 - 2006 Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.  
*Título: CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TIOL-PEROXIDASE DE Mycoplasma hyopneumoniae EM Escherichia coli.*  
*Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.*  
*Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .*

2001 - 2002 Ensino Médio (2º grau).  
Weston High School.

1999 - 2001 Ensino Médio (2º grau).  
Colégio de Aplicação.

1997 - 1998 Ensino Fundamental (1º grau).  
Colégio de Aplicação.

### Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

### Prêmios e títulos

2006	Destaque seção Genética Molecular III do XVIII Salão de Iniciação Científica, UFRGS.
------	--------------------------------------------------------------------------------------

### Produção em C, T & A

#### Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ MACHADO, C. X. ; SCHUCK, D. ; Pinto, P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . CHARACTERIZATION OF THE THIOL-PEROXIDASE FROM THE SWINE PATHOGEN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq e XI Congresso da PABMB. São Paulo, SP : SBBq, 2008.
2. MACHADO, C. X. ; Pinto, P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . CHARACTERIZATION OF A 1-CYS PEROXIREDOXIN FROM THE SWINE PATHOGEN *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: X Reunião Anual do PPGBCM - CBIOT/UFRGS, 2008, Porto Alegre, RS. Anais da X Reunião Anual do PPGBCM - CBIOT/UFRGS, 2008.
3. ★ MACHADO, C. X. ; SCHUCK, D. ; Pinto, P. M. ; Costa, A. P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . CLONING AND EXPRESSION OF A THIOL-PEROXIDASE FROM THE SWINE PATHOGEN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador - BA. Livro de Resumos da XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007.
4. MACHADO, C. X. ; SCHUCK, D. ; Pinto, P. M. ; Costa, A. P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TIOL-PEROXIDASE DO PATÓGENO SUÍNO *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. In: IX Reunião Anual do PPGBCM - CBIOT/UFRGS, 2007, Porto Alegre, RS. Anais da IX Reunião Anual do PPGBCM - CBIOT/UFRGS, 2007.
5. ★ MACHADO, C. X. ; SCHUCK, D. ; Costa, A. P. M. ; BRESOLIN, T. ; Pinto, P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . CLONAGEM E EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Escherichia coli*. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu - PR. Livro de Resumos do 52º CBG e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006. p. 687-687.
6. Costa, A. P. M. ; SCHUCK, D. ; MACHADO, C. X. ; Ferreira, H. B. ; Zaha, A. . Clonagem, expressão e caracterização imunológica de um antígeno recombinante de *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º

Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu - PR. Livro de Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética, 2006. p. 833-833.

7. ★ MACHADO, C. X. ; SCHUCK, D. ; Pinto, P. M. ; Costa, A. P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . EXPRESSÃO DA TIOL-PEROXIDASE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Escherichia coli*. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006. p. 472-472.
8. Costa, A. P. M. ; SCHUCK, D. ; BRESOLIN, T. ; MACHADO, C. X. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DE UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006. p. 471-472.
9. ★ MACHADO, C. X. ; Pinto, P. M. ; Costa, A. P. M. ; Zaha, A. ; Ferreira, H. B. . CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TIOL-PEROXIDASE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Escherichia coli*. In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre. Livro de Resumos do XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005.
10. Costa, A. P. M. ; Pinto, P. M. ; CHEMALE, G. ; ZANDONAI, A. ; MACHADO, C. X. ; Ferreira, H. B. ; Zaha, A. . EXPRESSÃO EM *ESCHERICHIA COLI* DA HSP70 DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. In: XVII Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre. Livro de Resumos do XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005.

### Eventos

#### Participação em eventos

1. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq e XI Congresso da PABMB.CHARACTERIZATION OF THE THIOL-PEROXIDASE FROM THE SWINE PATHOGEN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. 2008. (Congresso).
2. X Reunião Anual do PPGBCM - CBiot/UFRGS.CHARACTERIZATION OF A 1-CYS PEROXIREDOXIN FROM THE SWINE PATHOGEN *Mycoplasma hyopneumoniae*. 2008. (Encontro).
3. XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference.CLONING AND EXPRESSION OF A THIOL-PEROXIDASE FROM THE SWINE PATHOGEN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. 2007. (Congresso).
4. IX Reunião Anual do PPGBCM - CBiot/UFRGS.EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TIOL-PEROXIDASE DO PATÓGENO SUÍNO *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*. 2007. (Encontro).
5. 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética.CLONAGEM E EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Escherichia coli*. 2006. (Congresso).



6. Como Publicar um Artigo Científico. 2006. (Seminário).
7. XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. EXPRESSÃO DA TIOL-PEROXIDASE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Escherichia coli*. 2006. (Outra).
8. 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2006. (Outra).
9. XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. 2005. (Congresso).
10. Biotecnologia: ética e qualidade de vida. 2005. (Seminário).
11. XVII Salão de Iniciação Científica. CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TIOL-PEROXIDASE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Escherichia coli*. 2005. (Outra).
12. 50º Congresso Brasileiro de Genética. 2004. (Congresso).
13. I Workshop de Combate à Tuberculose no Rio Grande do Sul. 2004. (Oficina).
14. Discussão Sobre Pesquisa Utilizando Células Tronco Embrionárias Humanas. 2003. (Seminário).