

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**VIABILIDADE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E *Mycoplasma
hyorhinis* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação de Mestrado

Laura Scherer Beier

Porto Alegre, Abril de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**VIABILIDADE DE MICOPLASMAS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Laura Scherer Beier

Orientadora: Profa. Dra. Irene Silveira Schrank

Co-orientadora: Dra. Franciele Maboni Siqueira

Porto Alegre, Abril de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microorganismos Diazotróficos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio da Rede Avançada em Biologia Computacional (RABICÓ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Irene Silveira Schrank, por ter me recebido em seu laboratório e pelos ensinamentos transmitidos.

À minha co-orientadora, Dra. Franciele Maboni Siqueira, pela paciência, pelo incentivo e pelos ensinamentos. Agradeço também pela amizade, conselhos e amparos sempre que necessário, e, por muitas vezes, ser muito mais que uma co-orientadora.

Aos professores do Centro de Biotecnologia da UFRGS, que de certa forma ajudaram durante a realização do trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório 222. À Amandinha, pelas risadas diárias e companhia agradável. À Scheila, pela paciência na montagem de gráficos no GraphPad e pelas piadinhas que alegravam os dias. Ao Tiago, por cuidadosamente ditar inúmeras placas de qPCR, além da diária atualização política, econômica e social. À Camila e à Gabriela, pela paciência em me mostrar onde ficava todo e qualquer reagente no laboratório durante os meus primeiros dias.

À minha família, especialmente meus pais, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Por acreditarem em mim e nas minhas escolhas. Agradeço também pela paciência em momentos de angústia. Agradeço à minha irmã, pelos momentos de descontração e diversão.

Às minhas amigas pela amizade, pela compreensão em momentos difíceis, e por estarem sempre presentes. À Eamim, por me apresentar a Fran, tornando essa conquista possível.

Ao meu namorado, pela ajuda, apoio, paciência e incentivo indispensáveis. Por segurar a barra e manter a calma durante meus faniquitos. Por tentar, e conseguir, me fazer mais feliz.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e aos financiadores pelo auxílio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. O GÊNERO <i>MYCOPLASMA</i>	12
1.2. PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA	15
1.3. CULTIVO DE <i>MYCOPLASMA</i>	17
1.3.1. MEIO MÍNIMO	19
1.4. DETECÇÃO DE <i>MYCOPLASMA</i>	20
1.5. CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	22
1.6. REGULAÇÃO GÊNICA EM <i>MYCOPLASMA</i>	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. JUSTIFICATIVA	28
4. RESULTADOS	29
4.1. MANUSCRITO.....	30
4.2. ARQUIVOS SUPLEMENTARES DO MANUSCRITO.....	66
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES.....	84
7. PERSPECTIVAS.....	85
8. REFERÊNCIAS.....	86
9. CURRICULUM VITAE	93

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fluxograma do cultivo e processamento das amostras.** A: processamento para medir a taxa de crescimento nos meios definidos para comparação com o meio complexo. B: avaliação do crescimento em diferentes tempos de cultivo de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* em meio Friis e CMRL+. MHP: *M. hyopneumoniae*; MHR: *M. hyorhinis*..... 59
- Figura 2: Fluxograma do teste de viabilidade.** Alteração de pH foi visualizada pela mudança na cor do meio. MHP: *M. hyopneumoniae*; MHR: *M. hyorhinis*.60
- Figura 3: Fluxograma do protocolo para avaliar presença de reulação gênica.** MHP: *M. hyopneumoniae*; MHR: *M. hyorhinis* 61
- Figura 4: Número total de células em cada meio, por FCM.** A: número total de células de *M. hyopneumoniae* nos meios definidos e complexo. B: número total de células de *M. hyorhinis* nos meios definidos e complexo. Os meios de cultivo (i) não apresentam diferença estatística entre si e são estatisticamente diferentes dos meios (ii). Vinte e quatro horas de cultivo são representadas pelas barras pretas, 48 h de cultivo são representadas por barras cinzas. Dados apresentados como média±SEM 62
- Figura 5: Número total de células nos diferentes tempos de cultivo.** A: total de células em 5 mL de cultivo de *M. hyopneumoniae* em Friis (barras pretas) e em CMRL+ (barras cinzas). Um cultivo independente foi usado para cada tempo de incubação. 63
- Figura 6: Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos nas três condições de cultivo.** Demonstração do total de genes comuns e exclusivos diferencialmente expressos na condição padrão, de choque térmico e de estresse oxidativo.64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Expressão diferencial dos genes em diferentes meios e condições de cultivos	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C – graus Celsius

ATP – trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)

C – citosina

CCU – do inglês *Color Changing Unit*

cDNA – DNA complementar

CO₂ – gás carbônico

DEPC – dicarbonato de dietila (do inglês *diethylpyrocarbonate*)

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTT – ditioneitol

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina (no inglês *flavine adenine dinucleotide*)

FCM – citometria de fluxo (do inglês *Flow Cytometry Method*)

FSC – parâmetro de citometria relacionado com o volume celular (do inglês *Forward Scatter*)

g – força centrífuga

G – guanina

GRN – filtro detector de fluorescência verde (do inglês *green*)

h – horas

L – litro

mg – miligrama

min – minutos

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

ng – nanograma

O₂ – oxigênio

ORF – fase de abertura de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)
PES – Pneumonia Enzoótica Suína
pH – potencial de hidrogênio
qPCR – PCR quantitativo
RNA – ácido ribonucleico
RT – reação de transcriptase reversa (do inglês *Reverse Transcriptase*)
sRNA – pequeno RNA (do inglês *small RNA*)
SSC – parâmetro de citometria relacionado com a complexidade da partícula (do inglês *Side Scatter*)
T_m – temperatura de fusão
TNF- α – fator de necrose tumoral
U – unidade
UFC – unidade formadora de colônia
 μ g – micrograma
 μ L – microlitro

RESUMO

Micoplasmas estão difundidos pela natureza e são caracterizados por um genoma relativamente pequeno, baixo conteúdo GC e ausência de parede celular e de algumas rotas biossintéticas. *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, capaz de colonizar o trato respiratório e seu crescimento *in vitro*, comparado com o de outros micoplasmas, é mais lento. *Mycoplasma hyorhinis* também é encontrado no trato respiratório de suínos. Devido à falta de algumas vias biossintéticas, micoplasmas são incapazes de sintetizar alguns nutrientes e componentes essenciais, sendo forçados a obtê-los do ambiente. Assim, um dos maiores empecilhos enfrentados na pesquisa e diagnóstico de micoplasma tem sido a dificuldade do cultivo *in vitro*. Portanto, o desenvolvimento de um meio de composição definida que sustente o crescimento celular serviria como uma ferramenta controladamente manipulável, permitindo a definição de suas vias metabólicas assim como análises genéticas. O objetivo do presente estudo foi analisar a viabilidade, taxa de crescimento e regulação gênica de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* em diferentes meios de cultivo, assim como em diferentes condições de cultura. Neste trabalho, foi utilizado o meio Friis (1975) como meio complexo, e quatro meios definidos: (i) meio descrito para *Mycoplasma pneumoniae* por Yus *et al.* (2009); (ii) meio Yus sem adição de peptona; (iii) meio comercial CMRL e (iv) meio CMRL+ (complementado com lipídeos, aminoácidos e vitaminas). A viabilidade celular foi avaliada em todos os meios definidos e a taxa de crescimento de ambas as espécies nos cinco meios foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que a composição do meio influencia no crescimento da bactéria, uma vez que há diferença entre a concentração celular em cada meio testado. Entretanto, ambas as espécies apresentaram concentração celular semelhante em cada meio. Os resultados demonstram que, dentre os meios definidos testados, o meio CMRL+, desenvolvido no presente estudo, é o meio mais adequado, podendo ser considerado um meio de manutenção para estes microrganismos. Para a avaliação da regulação gênica através de qPCR, *M. hyopneumoniae* foi cultivado em meio Friis e CMRL+ sendo posteriormente submetido a condições de estresse (choque térmico e estresse oxidativo). Os resultados obtidos sugerem que *M. hyopneumoniae* altera seus níveis transcricionais mais rapidamente quando cultivado em meio CMRL+, provavelmente devido ao estresse duplo causado pela privação nutricional e estresse oxidativo ou choque térmico. Na condição de choque térmico, o tipo de regulação predominante diferiu entre os dois meios, enquanto que, quando submetido a estresse oxidativo, os genes apresentaram um padrão de regulação semelhante entre Friis e CMRL+. O meio de cultivo definido CMRL+ forneceu uma taxa de crescimento semelhante à do meio complexo Friis, e demonstrou presença de regulação gênica em *M. hyopneumoniae* em resposta à sua composição e às condições de estresse testadas. Portanto, este meio pode ser usado como uma ferramenta para o avanço da pesquisa com *Mycoplasma*.

Palavras-chave: *Mycoplasma*, Meio Definido, Regulação Gênica, Citometria de Fluxo

ABSTRACT

Mycoplasmas are widespread in nature, and are characterized by a relative small genome, low GC content, absence of cell wall and lack of some biosynthetic pathways. *Mycoplasma hyopneumoniae* is the infective agent of enzootic pneumonia in swine, able to colonize the respiratory tract. Its growth is slower than other porcine mycoplasmas. *Mycoplasma hyorhinis* is also found in the porcine respiratory system. Typically, it's the first mycoplasma that grows in culture, and its presence can frequently prevent the isolation of other *Mycoplasma* spp. Due to the lack of some biosynthetic pathways, mycoplasmas are incapable of synthesize some nutrients and essential compounds, being forced to obtain from the environment. Therefore, the major impediment to *Mycoplasma* research and laboratory diagnosis has been the difficulty of *in vitro* cultivation. Thus, the development of a defined medium that support mycoplasma growth would provide a tool that can be controllably manipulated to enable the definition of mycoplasmal metabolic pathways as well as genetic analysis. The aim of this work was to analyze viability, growth rate and gene regulation of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* in different culture media, and cultivation conditions. In this work, we used Friis broth (1975) as a complex medium, and four different defined media: (i) a medium described for *M. pneumoniae* by Yus *et al.* (2009), (ii) defined Yus medium without peptone, (iii) commercial medium CMRL and (iv) CMRL+ medium (supplemented with lipids, amino acids and vitamins). All the defined media were tested towards cell viability and the growth rate of both species in the five media was assessed, through flow cytometry assay comparing between them. The results from flow cytometry assay showed that the composition of the media influences the bacterial growth, once cell concentration in each of the tested media was different. However, both species presented similar cell concentration in each media. The results demonstrate that, amongst the defined media tested, CMRL+ broth, developed in this study, is the most suitable, even though it's only a maintenance broth. To gene regulation assessment, *M. hyopneumoniae* was cultivated in Friis and CMRL+ and underwent two stress conditions (heat shock and oxidative stress). Results suggest that *M. hyopneumoniae* alters the transcriptional levels of some genes more promptly when cultivated in CMRL+ broth, probably due to the dual stress caused by the combination of nutrients deprivation in CMRL+ broth plus heat shock or oxidative stress. In the heat shock condition, the prevailing kind of regulation differed between the two media, while when submitted to oxidative stress, genes presented similar pattern of regulation between Friis and CMRL+. CMRL+ medium provided a growth rate resembling the complex broth and *M. hyopneumoniae* showed to have gene expression regulation in response to its composition and to the culture conditions tested. Thus, it can be used as a tool that can be controllably manipulated enabling the definition of mycoplasmal nutritional requirements and metabolic pathways as well as genetic analysis, such as gene regulation.

Keywords: *Mycoplasma*, Defined Medium, Gene Regulation, Flow Cytometry

1. INTRODUÇÃO

1.1. O GÊNERO *MYCOPLASMA*

A classe *Mollicutes* representa uma categoria de bactérias que apresentam algumas características em comum, como pequeno tamanho celular, genoma reduzido, ausência de parede celular, além de conterem rotas metabólicas limitadas (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007). O primeiro cultivo de micoplasma foi relatado em 1898, e, durante muito tempo, foram considerados vírus (Razin e Hayflick, 2010). Atualmente, micoplasmas são considerados bactérias que evoluíram de um organismo Gram-positivo com um baixo conteúdo G+C, provavelmente por evolução degenerativa (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007; Razin e Hayflick, 2010).

A ausência de parede celular confere propriedades únicas aos micoplasmas, como sensibilidade a detergentes e choque osmótico, assim como resistência à penicilina (Razin e Hayflick, 2010). Da mesma maneira, seu genoma diminuto resulta em uma reduzida capacidade codificadora, assim como a presença de vias metabólicas insuficientes (Vasconcelos *et al.*, 2005; Siqueira, *et al.*, 2014; Ferrarini *et al.*, 2016). Com tal característica, são considerados organismos fastidiosos de serem cultivados sob condições laboratoriais (Citti e Blanchard, 2013), por possuírem um requerimento nutricional complexo. São dependentes de suprimentos externos de precursores biossintéticos, incluindo aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos e esteroides (Baseman e Tully, 1997). Poucas atividades metabólicas estão relacionadas com o suprimento de substratos para vias sintéticas, havendo uma convergência para a geração de energia. Mesmo assim, o rendimento energético dessas rotas em *Mollicutes* é baixo e gera quantidades elevadas de metabólitos potencialmente tóxicos para o hospedeiro (Razin e Hayflick, 2010). Entretanto, alguns micoplasmas parasitas apresentam crescimento detectável apesar do rendimento energético comprometido. Este fato pode ser justificado pelo pequeno investimento de ATP necessário para as limitadas rotas metabólicas (Razin *et al.*, 1998).

Atualmente, estão descritos no “Taxonomy” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) 134 espécies de *Mycoplasma*. Micoplasmas são amplamente difundidos na natureza, sendo encontrados como organismos comensais, simbiontes ou parasitas de mamíferos, artrópodes, répteis, peixes e plantas embora apresentem uma

elevada especificidade por hospedeiro e tecido. No caso de espécies patogênicas, a infecção geralmente apresenta um curso crônico, sendo raros os episódios fulminantes (Razin e Hayflick, 2010).

As diversas espécies de *Mycoplasma* são responsáveis por doenças importantes em seus hospedeiros, embora ainda haja uma fração que não desencadeia um quadro infeccioso, interagindo com a microbiota normal do hospedeiro (Razin *et al.*, 1998). Dentre as espécies que causam um impacto relevante no trato respiratório de suínos estão *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare* e *Mycoplasma hyorhinis* (Mare e Switzer, 1965; Friis, 1975).

M. hyopneumoniae, uma das espécies capazes de infectar suínos, é considerado o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, além de contribuir significativamente para a instauração de um quadro mais complicado, denominado de “Porcine Respiratory Disease Complex” (PRDC) (Thacker *et al.*, 1999). Essa condição é responsável por grandes perdas econômicas na produção de suínos, por causar crescimento lento, baixa conversão alimentar e predisposição a infecções pulmonares bacterianas (Kobisch e Friis, 1996). O cultivo de *M. hyopneumoniae* é trabalhoso e demorado, mas pode ser realizado em meio de composição complexa, sem presença de células. Entretanto, esta bactéria apresenta um crescimento mais lento, quando comparado a outros micoplasmas que colonizam suínos (Kobisch e Friis, 1996; Zimmerman *et al.*, 2012). *M. hyopneumoniae* é um patógeno que coloniza o trato respiratório ao se ligar às microvilosidades do epitélio das vias aéreas inferiores. Essa aderência ao trato respiratório resulta em uma aglomeração e perda das microvilosidades, com consequente ciliostase e morte das células epiteliais, causando uma diminuição da função do aparato mucociliar (Thacker, 2004). Sua transmissão é, geralmente, horizontal, de suínos infectados a não-infectados, mas pode também ocorrer verticalmente, entre a fêmea e sua prole, devido ao contato próximo durante o período de aleitamento (Piffer e Ross, 1984). *M. hyopneumoniae* é capaz de reprimir o sistema imune celular e humoral do hospedeiro durante os estágios iniciais da pneumonia por inibir a fagocitose mediada por macrófagos e produção de anticorpos pelas células-B (Schafer *et al.*, 2007).

M. hyorhinis também é frequentemente encontrado em suínos, sendo considerado um colonizador normal das vias aéreas superiores do trato respiratório de suínos jovens (Ross e Young, 1993). Assim como *M. hyopneumoniae*, também se adere às células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior e inferior de suínos (Zimmerman *et al.*, 2012). Seu habitat normal são as membranas mucosas do trato respiratório superior e amígdalas, sendo considerado patogênico e atuando no complexo etiológico de pneumonia em suínos (Kobisch e Friis, 1996). Entretanto, também é capaz de colonizar outros tecidos, como o tecido cardíaco e as articulações, podendo causar poliserosite e artrite. O mecanismo que permite a evasão de *M. hyorhinis* do sistema respiratório e a posterior indução de doenças sistêmicas ainda é desconhecido, embora tenha sido relatado que a presença de outros patógenos ou estresse possam facilitar sua propagação (Zimmerman *et al.*, 2012). Quando são analisadas doenças causadas por *Mycoplasma* spp. através de cultivo microbiológico, geralmente *M. hyorhinis* é a primeira espécie a se multiplicar em cultura e sua presença pode acabar inibindo o isolamento de outras espécies (Kobisch e Friis, 1996; Thacker, 2004; Zimmerman *et al.*, 2012). Além do seu impacto na produção de suínos, *M. hyorhinis* ainda é considerado uma fonte de contaminação celular comum (Razin e Hayflick, 2010). Essa contaminação ocorre devido ao uso de materiais de origem animal e vegetal em culturas celulares, como, por exemplo, tripsina e soro (Razin e Hayflick, 2010).

O trato respiratório dos suínos ainda pode ser colonizado por uma terceira espécie, *M. flocculare*, cujo impacto econômico causado é menor (Zimmerman *et al.*, 2012). Esta espécie está amplamente distribuída pelos sistemas de produções de suínos, sendo estes seus únicos hospedeiros. Foi isolada pela primeira vez em 1972, na Dinamarca (Friis, 1972) não tendo sido isolada a partir de nenhum outro mamífero desde então. Por ser isolada a partir de pulmões de animais acometidos e não acometidos por pneumonia, *M. flocculare* é considerado uma espécie não patogênica, embora seja capaz de induzir infiltrações linfocíticas no tecido nasal (Friis, 1972; Kobisch e Friis, 1996). Além do trato respiratório, também é capaz de colonizar a cavidade conjuntiva ocular (Kobisch e Friis, 1996). Considerando seu cultivo microbiológico, assim como *M. hyopneumoniae*, também é um micro-organismo fastidioso e de crescimento demorado quando comparado a outras espécies de *Mycoplasma* colonizadoras do trato respiratório de suínos (Kobisch e Friis, 1996).

1.2. PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA (PES)

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma das enfermidades que mais acomete suínos em todo o mundo, sendo considerada uma pneumonia leve e crônica, de baixa mortalidade, porém com alta morbidade, comumente complicada por infecções por outras bactérias oportunistas e vírus (Kobisch e Friis, 1996; Thacker *et al.*, 1999). A habilidade dos micoplasmas de imunomodular a responsividade do hospedeiro contribui para sua patogenicidade, permitindo que evitem ou suprimam os mecanismos de defesa do hospedeiro. Por isso, infecções causadas por micoplasmas patogênicos raramente são do tipo fulminante, sendo capazes de estabelecerem um quadro infeccioso crônico e persistente (Razin *et al.*, 1998). A infecção por *M. hyopneumoniae* causa um grande impacto econômico negativo, devido ao menor desempenho na evolução e ganho de peso do animal, além de gastos recorrentes com medicação e métodos de prevenção (Maes *et al.*, 2008).

O primeiro sinal clínico associado com a infecção por *M. hyopneumoniae* é tosse seca, esporádica e não-produtiva. Outros sinais clínicos, como febre e comprometimento do crescimento, estão relacionados com invasores secundários, como *Pasteurella multocida* (Thacker *et al.*, 1999). Durante a infecção, além da colonização das vias aéreas, há uma estimulação de uma reação inflamatória prolongada, supressão e modulação das respostas inata e adaptativa, assim como interação com outros agentes infecciosos (Zimmerman *et al.*, 2012), o que torna o hospedeiro ainda mais susceptível a infecções secundárias. A lesão típica da pneumonia enzoótica suína consiste em áreas bem demarcadas de consolidação, de coloração roxo avermelhado quando em fase aguda, ou cinza escuro na fase crônica (Thacker *et al.*, 1999). A ocorrência, severidade e curso da pneumonia enzoótica suína são influenciados por diversos fatores, como a virulência do organismo assim como a ocorrência de patógenos respiratórios adicionais e fatores de risco, como o manejo dos animais e condições de aleitamento (Thacker *et al.*, 1999).

Existem duas formas de ocorrência da pneumonia enzoótica suína: epidêmica e endêmica. A primeira é rara e ocorre quando o organismo é introduzido a um rebanho que, até então, não foi exposto a micoplasmas. Deste modo, animais de todas as idades se

tornam susceptíveis e a doença é rapidamente alastrada, devido à acelerada colonização de animais não-imunes. Neste caso, pode ser observado tosse, dificuldade ao respirar, piroxia e, ocasionalmente, os animais infectados podem vir a óbito. A ocorrência endêmica é a forma mais comum. O início da infecção é difícil de determinar, pois afeta primeiramente poucos animais e lentamente acaba afetando a vara. A cultura de *M. hyopneumoniae* é considerada o padrão ouro para a detecção e diagnóstico do organismo, mas seu isolamento é difícil, devido ao seu crescimento demorado (Thacker, 2004), além de ser facilmente inibido pela presença de outros micoplasmas (Kobisch e Friis, 1996; Thacker, 2004; Zimmerman *et al.*, 2012). Assim, o isolamento com fins de diagnóstico se torna um desafio muitas vezes frustrante, com possíveis resultados falso-negativos. A detecção de *M. hyopneumoniae* nos pulmões por anticorpo fluorescente ou imunohistoquímica são métodos rápidos, baratos e comumente utilizados em laboratórios de diagnóstico veterinário, porém seus resultados podem ser ambíguos, uma vez que *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare* compartilham determinantes antigênicos. O desenvolvimento de análises por PCR (do inglês “Polymerase Chain Reaction”) forneceu um método mais sensível e específico para a confirmação da presença de *M. hyopneumoniae* em diversas amostras e vem sendo cada vez mais utilizado no diagnóstico (Kobisch e Friis, 1996; Zimmerman *et al.*, 2012). Testes baseados em reações antígeno-anticorpo (ELISA) para a detecção de *M. hyopneumoniae* estão disponíveis no mercado e estudos já demonstraram sua alta especificidade em detectar soros negativos para anticorpos, resultando em uma baixa taxa de resultados falso-positivos (Thacker, 2004).

Diversos estudos relacionados ao melhor tratamento foram realizados, mas seus resultados são variáveis e conflitantes (Williams, 1978; Hannan *et al.*, 1989; Terlaak *et al.*, 1991; Cooper *et al.*, 1993; Tanner *et al.*, 1993; Godinho, 2008). A falta de parede celular restringe a diversidade de antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *Mycoplasma* spp., por isso não respondem ao tratamento com agentes que interferem na síntese da mesma, como β -lactâmicos. Os antibióticos comumente utilizados são os da classe das tetraciclinas, macrolídeos e alguns da classe das fluorquinolonas (Kobisch e Friis, 1996). Há relatos de resistência adquirida contra tetraciclinas e macrolídeos, porém ainda não representa um grande problema para o tratamento de infecções causadas por *M. hyopneumoniae* (Maes *et al.*, 2008). Além da antibioticoterapia, a prevenção do

desenvolvimento da pneumonia enzoótica suína é um método eficaz para diminuir o impacto econômico desta doença dentro da vara.

O controle e prevenção dependem das condições ambientais em que se encontra o animal acometido, como qualidade do ar, temperatura, ventilação e manejo além de medidas de biossegurança. A vacinação dos animais contra *M. hyopneumoniae* ajuda a controlar a propagação da doença (Kobisch e Friis, 1996; Zimmerman *et al.*, 2012). Algumas das grandes vantagens proporcionadas pela vacinação, independente da estratégia utilizada, incluem melhoramento no ganho de peso diário, na taxa de conversão alimentar e, em alguns casos, diminuição da taxa de mortalidade (Kobisch e Friis, 1996; Maes *et al.*, 2008). A diminuição da densidade animal durante os diferentes estágios de produção demonstrou reduzir significativamente o nível de doenças respiratórias, visto que a superpopulação pode causar um aumento na transmissão de patógenos (Maes *et al.*, 2008). Da mesma maneira, varas mais numerosas tendem a ser mais propensas a apresentarem uma maior prevalência de doenças. A prevenção de outras doenças para evitar qualquer dano no pulmão também é necessária para a diminuição de casos de PES (Maes *et al.*, 2008; Zimmerman *et al.*, 2012).

1.3. CULTIVO DE MYCOPLASMA

Micoplasmas são organismos fastidiosos, de difícil cultivo em condições laboratoriais (Citti e Blanchard, 2013) e possuem um número de genes limitados, o que resulta na falta de algumas rotas biossintéticas, sendo incapazes de sintetizar alguns nutrientes e componentes essenciais para sua sobrevivência (Pollack *et al.*, 1997; Gardner e Minion, 2010; Razin e Hayflick, 2010). Essa característica impõe requerimentos nutricionais complexos, tornando-os dependentes de suprimentos de precursores externos, como aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos e esteroides (Baseman e Tully, 1997). Essas necessidades nutricionais são supridas, para a maioria das espécies de micoplasmas, através da utilização de um meio rico e complexo, suplementado com soro (Friis, 1975).

Um dos requerimentos nutricionais mais notável dos micoplasmas são os lipídeos e seus precursores, necessários para a síntese da membrana (Razin e Tully, 1970). No entanto, na determinação de um meio de cultivo de composição definida, o uso do soro animal como fonte desses nutrientes é impedido. A dificuldade no desenvolvimento deste

novo meio consiste em fornecer os lipídeos essenciais em um meio aquoso, de modo que se faz necessário o uso de um carreador (Razin, 1969). Como necessitam de esterol para seu crescimento e são incapazes de sintetizar ácidos graxos de cadeia longa, estes são incorporados na membrana quando disponíveis. Assim, a composição lipídica da membrana é alterada de acordo com os lipídeos fornecidos, com conseqüente alteração de suas propriedades (Razin e Tully, 1983). Embora uma limitada capacidade de sintetizar aminoácidos tenha sido encontrada em algumas espécies de *Mycoplasma*, estudos demonstram uma dependência absoluta do fornecimento externo destes (Razin, 1969). Ainda que não experimentalmente comprovado, *Mycoplasma* aparenta possuir um sistema de transporte para amidas, mas não para ácidos (Razin, 1969). Como fonte primária de carbono e energia, acredita-se que *Mycoplasma* metaboliza glicose ou arginina (Stemke e Robertson, 1990). No caso da arginina, a fonte deste aminoácido pode ser proteínas presentes no meio de cultivo que são degradadas por proteases secretadas pelos micoplasmas durante seu crescimento (Pollack *et al.*, 1997). Além disso, micoplasmas possuem um metabolismo com rendimento energético insuficiente, precisando consumir grandes quantidades de substrato para manter um estoque energético favorável para síntese de macromoléculas (Razin e Tully, 1983).

Pouco se sabe sobre a influência de ácidos nucléicos e seus constituintes sobre o crescimento de *Mycoplasma*. O uso de um meio de cultivo complexo impede a análise desses requerimentos, uma vez que o extrato de levedura presente neste meio fornece, de maneira desconhecida, precursores de ácidos nucléicos. A partir de um meio descrito por Razin e Knight (1960a), foi demonstrado que a adição concomitante de concentrações adequadas de RNA e DNA possibilitam o crescimento de *M. laidlawii*. No entanto, a adição de purinas e pirimidinas (adenina, citosina, guanina e uracil), nucleosídeos (adenosina, guanosina, uridina e citidina), nucleosídeos-3'-fosfato (ácidos adenílico, guanílico, uridílico e citidílico) e seus isômeros 5'-fosfatos se mostraram inativas em promover o crescimento das espécies analisadas (Razin e Knight, 1960b). As necessidades vitamínicas ainda não foram determinadas para todas as espécies. *M. laidlawii* e *M. mycoides*, por exemplo, necessitam de ácido nicotínico, tiamina, coenzima A e riboflavina, sendo *M. synoviae* a única do gênero *Mycoplasma* que necessita de grande quantidade de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (Razin, 1969).

Além das necessidades nutricionais, espécies do gênero *Mycoplasma* ainda apresentam algumas exigências quanto às condições de incubação do cultivo, como temperatura, pH, concentração de oxigênio e tempo de cultivo. Stemke (1990) mostrou que culturas de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* se multiplicam mais rápido e atingem concentrações celulares maiores quando cultivadas em 8% de gás carbônico (Stemke e Robertson, 1990). Entretanto, aeração não possui efeito sobre o crescimento de espécies fermentadoras de *Mycoplasma* (Razin e Tully, 1983). Um maior crescimento foi observado quando o pH do meio estava em torno de 7 e a temperatura de incubação entre 33°C e 38°C (Stemke e Robertson, 1990). Todos esses aspectos tornam o cultivo de micoplasma trabalhoso, instável e demorado.

O cultivo de *Mycoplasma* apresenta algumas peculiaridades. Diferentemente de outras bactérias, *Mycoplasma* spp. não cresce adequadamente em meio sólido contendo ágar (Stemke e Robertson, 1990). As colônias de *M. hyopneumoniae* atingem um diâmetro de, no máximo, 0,3-0,5 mm somente após sete a 10 dias de cultivo (Cook *et al.*, 2016). Por possuírem massa celular menor que outros procariontos, não causam turbidez no meio de cultivo líquido (Razin e Tully, 1995), dificultando a detecção de crescimento.

1.3.1. MEIO MÍNIMO

Devido à sua capacidade codificadora limitada, micoplasmas precisam de suprimentos nutricionais externos. Diversos meios de cultura de composição complexa para diferentes espécies de *Mycoplasma*, que facilitam o cultivo por serem ricos em nutrientes, já foram descritos (Edward, 1947; Hayflick, 1965; Friis, 1975). Em geral, são compostos por peptona, extrato de levedura, para fornecer precursores de ácidos além de servir como fonte de fatores de crescimento, soro animal, que fornece ácidos graxos e lipídeos de maneira não tóxica, e sais para ajustar a tonicidade (Razin e Tully, 1983). Ainda assim, muitos micoplasmas não podem ser cultivados nos meios já descritos. Isso significa que não existe um único meio ou procedimento de cultura que seja adequado para o isolamento de todos os micoplasmas.

A determinação das necessidades nutricionais de um micro-organismo é importante para a elucidação de suas rotas biossintéticas e para entender os princípios básicos da regulação e organização do metabolismo bacteriano, assim como o impacto do tamanho

diminuto do genoma no caso dos micoplasmas (Yus *et al.*, 2009). Entretanto, o uso de meio complexo se apresenta como um obstáculo. Portanto, o uso de um meio mínimo definido, que sustente o crescimento de micoplasma permite uma avaliação mais racional das necessidades nutricionais destas bactérias. Algumas tentativas de simplificar esses meios substituindo o soro animal por misturas de colesterol, lipoproteínas, lecitina, ácido oleico entre outros, já foram apresentadas (Edward e Fitzgerald, 1951; Smith *et al.*, 1954; Smith, 1955), sendo que todos visam a obtenção de um meio o mais quimicamente definido possível. Mais recentemente, Yus *et al.* (2009) estudaram bioquímica e computacionalmente o metabolismo de *Mycoplasma pneumoniae*, com o objetivo de reconstruir e validar sua rede metabólica e regulação, complementando com dados de transcriptômica e proteômica. Análise do metabolismo revelou que *M. pneumoniae* possui um metabolismo mais linear quando comparado com outras bactérias, como *B. subtilis* (Yus *et al.*, 2009). Os autores apontaram três motivos que possivelmente justificam o crescimento lento de bactérias patogênicas de genoma reduzido: (a) menor eficiência enzimática, resultante do acúmulo de mutações oriundas da redução genômica; (b) menor quantidade de operons de RNA ribossomal, e/ou (c) outros mecanismos envolvidos na adaptação à patogenicidade.

1.4. DETECÇÃO DE MYCOPLASMA

Apesar do grande impacto econômico causado por infecções de *Mycoplasma*, existem apenas alguns laboratórios especializados capazes de trabalhar com esse patógeno fastidioso. Desde 1975, quando foi descrito o meio para crescimento e isolamento de *M. hyopneumoniae* (Friis, 1975), poucos avanços foram feitos na tentativa de amenizar as dificuldades encontradas.

A determinação de populações celulares de *Mollicutes* encontra diversos obstáculos técnicos. O primeiro obstáculo é encontrado frente ao tamanho celular, que por ser muito pequeno, exclui a possibilidade de contagem por microscopia óptica. O segundo obstáculo considera que muitas espécies formam microcolônias no meio de cultura (Calus *et al.*, 2010) ou se aderem à superfície do recipiente de cultivo, resultando em uma contagem celular subestimada. Do mesmo modo, devido às suas necessidades nutricionais, seu crescimento em meio sólido com ágar ou em meios muito diluídos é lento e possui baixo

rendimento celular, subestimando novamente a concentração celular (Razin e Tully, 1995). Consequentemente, por não possuírem parede celular, são corados insatisfatoriamente pela coloração de Gram normalmente utilizada para diferenciar espécies bacterianas. Além disso, a determinação clássica de células viáveis pela estimativa de unidades formadoras de colônias (UFC) de micoplasma não é trivial e requer semanas de incubação. Deste modo, a determinação de UFC também subestima o número de células vivas, se tornando inadequada (Calus *et al.*, 2010).

No cultivo de *Mycoplasma*, por possuírem menor massa e população celular, a detecção de turvação do meio não indica necessariamente proliferação celular, como no cultivo de outras bactérias (Kumari e Gupta, 2015; Munna *et al.*, 2015), podendo ser precipitação de componentes do meio devido a alterações de pH decorrente da utilização de substratos. Técnicas de nefelometria também não são sensíveis o suficiente para medir o crescimento de *Mycoplasma*. Além disso, proteínas celulares representam apenas uma pequena porção entre todas as proteínas contidas no meio de cultivo altamente rico e suplementado com soro suíno, excluindo métodos de quantificação de proteínas (Razin e Tully, 1995).

Rotineiramente, o crescimento é estimado monitorando alterações na cor do meio de cultura (vermelho quando recém inoculado, e amarelo após acidificação do meio como resultado da multiplicação) possível pela presença de vermelho de fenol como indicador de pH. Com a técnica denominada “Color Changing Unit” (CCU), descrita por Stemke e Robertson (1990), através de diluições seriadas pode-se obter a contagem de células viáveis para algumas espécies de *Mycoplasma*. Entretanto, esta técnica não pode ser generalizada para caracterização de crescimento, pois nem todas as espécies de *Mycoplasma* são capazes de alterar a cor do meio, além de não ser um método de alta precisão, haja visto que a mudança de cor nem sempre indica crescimento bacteriano (Stemke e Robertson, 1990). Alguns estudos apontam a detecção de luminometria de ATP para o monitoramento do crescimento ou quantificação de *Mollicutes* em meio de cultura, uma vez que a quantidade de ATP é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (Calus *et al.*, 2010). Porém, mesmo com sua sensibilidade, rapidez e adequabilidade para análise de *Mollicutes*, esta técnica é pouco empregada (Assuncao *et al.*, 2005; Calus *et al.*, 2010).

A citometria de fluxo (FCM) é capaz de rapidamente analisar célula por célula e, conseqüentemente, fornecer uma análise mais detalhada da população celular e sua heterogeneidade. As informações obtidas podem ser usadas para avaliar a viabilidade celular dos micro-organismos em estudo e sua sobrevivência em diferentes meios. Além disso, também permite a avaliação simultânea do estado fisiológico e estágios de crescimento, possibilitando uma análise multiparamétrica do comportamento metabólico (Buysschaert *et al.*, 2016). O uso de marcadores fluorescentes auxilia na distinção entre células viáveis e não viáveis, uma vez que se utilize fluoróforos que atravessam qualquer tipo de membrana celular juntamente com fluoróforos que são capazes apenas de penetrar em membranas danificadas (Assuncao *et al.*, 2005). Entretanto, a FCM também apresenta alguns empecilhos, desde a preparação das amostras à análise dos dados. O protocolo utilizado e a preparação da amostra são pontos críticos e necessitam de padronização, sendo responsáveis por grande parte da variação dos resultados. As lavagens, por exemplo, embora sejam importantes para a retirada de detritos e interferentes, ao mesmo tempo aumentam a chance de causar dano ou morte celular. Além disso, a dispersão da luz, princípio no qual se baseia a FCM, não diferencia com facilidade uma célula única de um agregado celular (Depince-Berger *et al.*, 2016). Apesar de suas múltiplas aplicações em microbiologia, o uso da FCM não é comumente empregado para a avaliação do crescimento de *Mollicutes*.

1.5. CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Micoplasmas são raramente expostos a grandes mudanças ambientais, pois são transmitidos de animal para animal e não sobrevivem por muito tempo quando fora do seu hospedeiro (Gardner e Minion, 2010). Entretanto, uma vez que o hospedeiro reage à infecção desenvolvendo resposta imune, o conseqüente recrutamento de neutrófilos e macrófagos ao local da infecção acaba por causar uma variação nas condições ambientais previamente encontradas pelo micoplasma. Portanto, patógenos bacterianos são submetidos a condições de estresse durante a colonização do hospedeiro e instauração do quadro infeccioso. Esses estresses podem resultar em alterações na expressão gênica, com o objetivo de compensar esse ambiente potencialmente letal desenvolvido no hospedeiro durante a infecção.

Uma característica comum relatada quanto a infecção causada por micoplasma é a sua capacidade de estimular macrófagos e monócitos a secretar citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela resposta inflamatória local e sistêmica (Razin *et al.*, 1998). A potencialização da pneumonia, por exemplo, causada por *M. hyopneumoniae* está diretamente relacionada com essa elevação na concentração de citocinas pró-inflamatórias, que atuam coordenando e ativando a resposta imune adaptativa, permitindo ao hospedeiro a eliminação do patógeno (Thanawongnuwech *et al.*, 2004). Portanto, um dos cenários comumente encontrados por *M. hyopneumoniae* durante a infecção é a elevação da temperatura corporal do hospedeiro, causada, por exemplo, pela aumentada concentração de TNF- α (Razin *et al.*, 1998). Portanto, se torna importante a compreensão das condições de crescimento que podem impactar a habilidade de *M. hyopneumoniae* de se adaptar e sobreviver em caso de mudanças no ambiente.

A elevação da concentração de citocinas gera um recrutamento significativo de macrófagos e neutrófilos, que se infiltram no local de infecção. A partir disso, outra condição encontrada por *M. hyopneumoniae* em seu hospedeiro durante a infecção é um ambiente com elevadas concentrações de radicais superóxidos, como o peróxido de hidrogênio. Este estresse oxidativo é um dos mecanismos empregados pelos neutrófilos e macrófagos do hospedeiro, visando a eliminação do patógeno (Schafer *et al.*, 2007). Em bactérias, a toxicidade de peróxido de hidrogênio é atribuída primeiramente a danos no DNA. Os radicais formados a partir da reação de peróxido de hidrogênio com o ferro celular livre podem causar modificações no DNA ou até quebra da dupla fita (Gusarov e Nudler, 2005). Desta maneira, é necessário que o organismo possua mecanismos capazes de contornar essas condições adversas causadas pela resposta imune. Entretanto, apesar do impacto causado por *M. hyopneumoniae* em suínos, existem poucos estudos que analisam seus mecanismos moleculares envolvidos na patogênese frente a mudanças ambientais.

1.6. REGULAÇÃO GÊNICA EM *MYCOPLASMA*

Micoplasmas geralmente se encontram em associação com seus hospedeiros, sendo raramente encontrados em ambientes externos (Gardner e Minion, 2010). Portanto, foi sugerido que com a perda de algumas rotas biossintéticas, os genes remanescentes responsáveis por funções básicas da célula, como replicação de DNA, transcrição e

tradução, seriam expressos constitutivamente, não havendo necessidade de uma regulação gênica sofisticada, uma vez que se encontram em um ambiente que não sofre grandes alterações (Muto e Ushida, 2002). Siqueira *et al.* (2014) realizaram uma análise do transcrito de espécies de *Mycoplasma* que colonizam o trato respiratório de suínos, e demonstraram que a maioria dos genes é transcrita em condições padrões de cultivo, indicando uma expressão a nível basal. Os resultados demonstraram que, como esperado, os produtos dos genes com maior nível de expressão estão relacionados com o metabolismo basal da célula, incluindo proteínas envolvidas na divisão celular, chaperonas e proteínas de transporte. Entretanto, o conhecimento sobre a expressão gênica em *Mycoplasma* é escasso e poucos trabalhos estudam os mecanismos envolvidos. A estagnação do conhecimento relacionado a regulação gênica em *Mycoplasma* ocorre devido às poucas ferramentas adequadas disponíveis para micoplasmas, especialmente para *M. hyopneumoniae* (Gardner e Minion, 2010). Recentemente, alguns estudos foram realizados na tentativa de expandir o conhecimento a respeito da transcrição gênica através de análises globais da transcrição em *M. hyopneumoniae* (Madsen, *et al.*, 2006; Madsen, 2006b; Schafer *et al.*, 2007; Madsen *et al.*, 2008; Oneal *et al.*, 2008; Siqueira, *et al.*, 2014).

Considerando a capacidade genômica limitada, pode-se inferir que micoplasmas possuem mecanismos regulatórios simples, o que é sustentado pelo fato de possuírem apenas um fator sigma associado a RNA polimerase, além da presença de alguns genes que codificam para repressores e poucos ativadores transcricionais identificados (Himmelreich *et al.*, 1996; Chambaud *et al.*, 2001; Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). A presença de somente um fator sigma em micoplasma sugere que a resposta a estímulos externos nestes organismos não é controlada pelo nível de expressão de fatores sigma alternativos (Razin *et al.*, 1998).

Apesar de a identificação de sequências promotoras ser importante para o entendimento da regulação gênica, poucos estudos foram feitos em relação à sequência que controla o início da transcrição em *Mycoplasma*. Em um estudo conduzido por Weber (2012) observou-se que 21 dos 23 genes analisados possuíam um padrão de sequência semelhante a região promotora -10 de *Escherichia coli*. Entretanto, não foi encontrado uma região correspondente ao elemento -35. Através de análise *in silico*, foi observado que a maioria das regiões codificantes (84%) possuía um único promotor putativo, embora algumas

apresentassem sequências promotoras adicionais internas a região codificante (Weber *et al.*, 2012).

Embora haja pouca informação a respeito do término da transcrição em *Mycoplasma*, ela é, aparentemente, independente do fator Rho, uma vez que não foram encontrados genes que codificam essa proteína (Razin *et al.*, 1998; Kingsford *et al.*, 2007; Mitra *et al.*, 2009). Neste caso, sequências típicas de terminadores intrínsecos que formam uma estrutura secundária de grampo (“stem-loop”), atuam como terminadores em *Mollicutes* (Razin *et al.*, 1998). Uma predição *in silico*, combinada com uma análise experimental, confirmou a presença de terminadores intrínsecos no genoma de *M. hyopneumoniae* (Fritsch *et al.*, 2015). O estudo demonstrou a presença de terminadores putativos em 82 % e 74 % das unidades monocistrônicas e policistrônicas, respectivamente, sendo que em 36 % das ORFs (do inglês “Open Reading Frame”) foi predito pelo menos uma sequência terminadora (Fritsch *et al.*, 2015).

Mesmo que a ocorrência de unidades transcricionais (Siqueira *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2013; Siqueira, *et al.*, 2014), promotores (Weber *et al.*, 2012; Siqueira, *et al.*, 2014) e terminadores (Fritsch *et al.*, 2015) esteja bem estabelecida em *M. hyopneumoniae*, a existência de outras sequências regulatórias ainda precisa ser esclarecida. Sabendo que repetições de DNA também podem ter uma importante função na regulação gênica, Cattani *et al.* (2016) realizaram uma predição *in silico* associada a uma validação experimental, com o objetivo de comprovar e associar a presença de repetições palindrômicas ou em *tandem* com processos de regulação gênica. O estudo revelou a presença dessas repetições nas regiões regulatórias de diferentes genes. Combinações de regiões palindrômicas, repetições em *tandem* e sequências promotoras foram encontradas em 92 % das unidades transcricionais de *M. hyopneumoniae*. Isso demonstra que a regulação gênica pode ser devido a diversos mecanismos diferentes (Cattani *et al.*, 2016). Regiões palindrômicas podem formar estruturas cruciformes, mediando a disponibilidade da região promotora, ou criar barreiras físicas, por exemplo. A análise experimental revelou expressão diferencial de genes com diferentes repetições na região a montante dos genes, reforçando a possível função regulatória das repetições palindrômicas e em *tandem* (Cattani *et al.*, 2016).

Como demonstrado por Siqueira *et al.* (2014), a análise transcritômica de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare* revelou a detecção de novos transcritos ainda não anotados. Estes transcritos incluem RNAs não-codificantes (Siqueira, *et al.*, 2014), que foram previamente relacionados com a regulação de processos importantes em outros micro-organismos (Guantes *et al.*, 2012; Lluch-Senar *et al.*, 2015). Esses pequenos RNAs (sRNA) regulam genes localizados em outras posições do genoma e possuem complementaridade limitada com seus alvos, podendo interagir com diversos alvos (Schultze *et al.*, 2014). Recentemente, uma análise global do genoma de *M. hyopneumoniae*, combinando estratégias *in silico* seguidas de confirmação experimental, detectou sRNAs e seus respectivos alvos (Siqueira *et al.*, 2016), sendo identificados 47 possíveis novos sRNAs. Entre os sRNAs, dois possuíam expressão diferenciada em resposta a estresse oxidativo e choque térmico, sugerindo que sua expressão seria influenciada por estímulos externos (Siqueira *et al.*, 2016). Considerando os genes alvos, alguns dos alvos preditos por Siqueira *et al.* (2016) estão relacionados com estresse ambiental sofrido pela célula (Madsen *et al.*, 2006; Schafer *et al.*, 2007) e/ou foram observados como altamente expressos em uma análise transcritômica (Siqueira *et al.*, 2014).

Alguns estudos demonstraram alteração do nível transcricional de genes de *M. hyopneumoniae* quando submetido a condições de estresse (Madsen *et al.*, 2006; Madsen *et al.*, 2006b; Schafer *et al.*, 2007; Madsen *et al.*, 2008; Oneal *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2016), o que sugere que *M. hyopneumoniae*, assim como outras bactérias, apresenta regulação gênica em resposta a estímulos ambientais. Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa alteração da atividade transcricional em resposta a esses estímulos ainda não são completamente conhecidos.

Portanto, o desenvolvimento de um meio de composição definida que suporte o crescimento de *Mycoplasma*, suprimindo suas demandas nutricionais, seria utilizado como uma ferramenta controladamente manipulável. Esta ferramenta proporcionaria avanços a respeito dos conhecimentos de requerimentos nutricionais de micoplasmas, além de auxiliar na elucidação de mecanismos de regulação gênica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho é testar diferentes meios de cultivo de composição definida que possam ser usados de maneira controladamente manipulável. O teste será feito, através da análise de viabilidade e taxa de crescimento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, assim como analisar a capacidade de *M. hyopneumoniae* responder transcricionalmente quando cultivado no meio de cultivo definido.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cultivar *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* em meio complexo Friis, e em quatro meios definidos: (i) YUS: meio descrito para *Mycoplasma pneumoniae* por Yus *et al.* (2009); (ii) YUSm: meio definido YUS sem adição de peptona; (iii) CMRL: meio comercial (Invitrogen, USA) e (iv) CMRL+: meio comercial CMRL complementado com lipídeos, aminoácidos e vitaminas.

Analisar a viabilidade de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* nos diferentes meios de cultura.

Avaliar a concentração celular de ambas as espécies em todos os meios testados por Citometria de Fluxo.

Determinar o meio definido que forneça a melhor taxa de crescimento.

Verificar alteração no perfil transcricional de *M. hyopneumoniae* quando cultivado no meio de composição definida que apresentar a melhor taxa de crescimento.

Analisar o perfil transcricional de genes selecionados de *M. hyopneumoniae* em diferentes condições de estresse *in vitro*: choque térmico e estresse oxidativo, cultivados em meio Friis e no meio definido com a melhor taxa de crescimento por RT-qPCR.

Comparar o perfil transcricional do cultivo padrão (crescimento por 24 h a 37°C) com os determinados nas condições de estresse.

3. JUSTIFICATIVA

A definição das necessidades nutricionais de um organismo é essencial para o entendimento de suas rotas biossintéticas. Como forma de superar as dificuldades relativas ao cultivo de *Mycoplasma*, um meio de composição complexa é utilizado. Entretanto, o uso de um meio definido, que sustente o crescimento de *Mycoplasma*, atuaria como uma ferramenta controladamente manipulável permitindo a definição de requerimentos nutricionais e rotas metabólicas de *Mycoplasma*, assim como análises genéticas.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o período do Mestrado estão contidos no Manuscrito abaixo, a ser submetido ao periódico “*Journal of Applied Microbiology*”.

O material suplementar referente ao manuscrito está apresentado no tópico 4.2.

4.1. MANUSCRITO:

Brief Title: Evaluation of *Mycoplasma* Minimal Medium

Running Title: Performance evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* grown in defined minimal medium

Laura Scherer Beier¹, Franciele Maboni Siqueira¹, Irene Silveira Schrank^{1,2*}

¹ Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

² Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* To whom correspondence should be addressed. Tel. +55 51 3308-60.55. Fax. +55 51 3308-73.09. E-mail: Irene@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

Aim

To develop and test defined media that could be used as a manipulative tool for *Mycoplasma* research, through the analysis of viability and growth rate of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis*. Confirm the presence of gene regulation in *M. hyopneumoniae* in the defined medium, analyzing the transcriptional profile in different culture media and during stress conditions.

Methods and Results

M. hyopneumoniae and *M. hyorhinis* were cultivated in a complex standard medium (Friis) and in four different defined media one of them developed in this work (YUS, YUSm, CMRL and CMRL+). The cell concentration of both *Mycoplasma* species was assessed in different time points in the different media by flow cytometry assay. Viability of the cells was also analyzed in all defined media and the results demonstrated the presence of viable mycoplasma cells in all tested media. The transcriptional response in CMRL+ broth defined media of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* was assessed by RT-qPCR. For both *Mycoplasma* species, only the CMRL+ defined media shows significantly similar quantity of cell in culture when compared to the rich medium. It was demonstrated that *M. hyopneumoniae*, besides responding to stress conditions, can also respond to nutritional stress at the transcriptional level.

Conclusion

All the defined media tested were able to maintain cell concentration and viability and, among them, the developed CMRL+ is the most suitable. Mycoplasma cultivated on

CMRL+ showed gene expression regulation in response to media composition and to the culture conditions tested.

Significance and Impact of the Study

In this study, it was developed a defined media (CMRL+), which can be used as a tool that can be controllably manipulated, enabling the definition of mycoplasmal nutritional requirements and metabolic pathways as well as genetic analysis, such as gene regulation.

Key-words: *Mycoplasma*, Defined Medium, Gene Regulation, Flow Cytometry.

INTRODUCTION

Mycoplasmas are bacteria that belong to the *Mollicutes* class, which have evolved from a common Gram-positive ancestor by degenerative evolution, marked by genomic downsizing (Citti and Blanchard 2013). As a result, *Mycoplasma* possess a small genome size, low GC content, absence of cell wall and simplified metabolic pathways (Sirand-Pugnet *et al.* 2007). *Mycoplasma hyopneumoniae* is the primary etiological agent of swine enzootic pneumonia, isolated in the majority of swine herds throughout the world (Kobisch and Friis 1996; Thacker 2004). *M. hyopneumoniae* has a slower growth when cultivated *in vitro*, in comparison to other porcine *Mycoplasma* spp. (Zimmerman *et al.* 2012). *Mycoplasma hyorhinis* is also found in the porcine respiratory system. This species is regarded as part of the etiological complex in pneumonia in swine and it is able to colonize other sites, such as cardiac or joint tissues (Kobisch and Friis 1996). *M. hyorhinis*, typically, is the first mycoplasma that grows in culture and its presence can prevent the isolation of other mycoplasmas (Zimmerman *et al.* 2012).

Due to the absence of several metabolic pathways, mycoplasmas are considered fastidious organisms that present difficult growth under laboratory conditions (Vasconcelos *et al.* 2005; Citti and Blanchard 2013). The lack of anabolic pathways led to complex nutritional requirements, being dependent on external supplies of biosynthetic precursors (Baseman and Tully 1997; Zimmerman *et al.* 2012; Siqueira *et al.* 2014; Ferrarini *et al.* 2016). For most *Mycoplasma* spp., these requirements are satisfied by a rich and complex medium supplemented with serum (Greenbergofrath *et al.* 1993). In order to obtain a defined minimal medium, Yus *et al.* (2009) analyzed biochemically and computationally *M.*

pneumoniae metabolism, aiming to understand the basic principles of bacterial metabolism organization and regulation (Yus *et al.* 2009).

The attempt to improve the knowledge related to the molecular basis of mycoplasma infection have been hampered due to the difficulty of *M. hyopneumoniae in vitro* cultivation (Minion *et al.* 2004). Despite complex nutritional requirements, the bacteria also need optimal incubation conditions, such as temperature, pH, O₂ concentration and a longer time of cultivation. Stemke and Robertson (1990) showed that cultures grew faster and reached higher concentrations when cultivated in 8% CO₂ (Stemke and Robertson 1990). Also, higher growth rates were detected at a pH around 7, and the temperature of cultivation between 33 and 38°C. These specific requirements are even complicated by the *Mycoplasma* spp. poor growth on agar, which leads to colony forming unit determinations not reliable due to its difficult detection (Stemke and Robertson 1990). Moreover, *Mycoplasma* spp. cells have smaller cellular mass than others prokaryotes, and consequently there is no turbidity developed in liquid media (Razin and Tully 1995).

Like other mycoplasmas, *M. hyopneumoniae* has few obvious ways to control gene expression (Minion *et al.* 2004; Vasconcelos *et al.* 2005; Siqueira *et al.* 2014), and are believed to control gene expression through rudimentary mechanisms. Mycoplasmas are known to have only a single sigma factor, transcriptional activators are rarely found and, in some species, a few genes for repressor-like proteins were identified (Gardner and Minion 2010). Also, palindromic structures, sequence duplication and degenerative repeats have been shown to play relevant role in gene regulation (van Belkum *et al.* 1998; Cattani *et al.* 2016). Up until now, only three transcriptional regulators have been found in *M. hyopneumoniae*, although it has been demonstrated that some genes were able to respond to

different stress conditions as previously demonstrated (Madsen *et al.* 2006a; Madsen *et al.* 2006b; Schafer *et al.* 2007; Oneal *et al.* 2008). Recently, a *M. hyopneumoniae* genome-wide search for sRNAs and its target genes was performed and allowed the identification of 47 putative novel sRNAs. Two of them revealed differential expression profile in response to oxidative and heat shock stress conditions, suggesting that their expression is influenced by environmental signals (Siqueira *et al.* 2016). Moreover, some of the predicted sRNAs targets (Siqueira *et al.* 2016) could be related to cell environmental stress (Madsen *et al.* 2006a; Schafer *et al.* 2007) and/or were found as highly expressed in a transcriptome analysis (Siqueira *et al.* 2014).

The aim of this work was to test defined media that could be used as a manipulative tool for *Mycoplasma* research, through the analysis of viability and growth rate of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* in different culture media. To confirm the presence of gene regulation during growth in the defined medium, the transcriptional profile of selected genes of *M. hyopneumoniae* were analyzed in different culture media and during oxidative and heat shock stress conditions.

MATERIALS AND METHODS

Viability and Growth Rate of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* in Different Culture Media

Culture Media

M. hyopneumoniae strain 7448 and *M. hyorhinis* ATCC 17981 were cultivated in a complex standard medium and in four different defined media. The standard medium used for mycoplasma cultivation is a complex broth described by Friis (1975), here named “Friss

broth” (Friis 1975). The four defined media comprised: (i) YUS broth: a defined medium for *M. pneumoniae* by Yus *et al.* (2009) (Yus *et al.* 2009), (ii) YUSm broth: a modification of the Yus medium, without peptone, (iii) CMRL broth: commercial medium CMRL (Invitrogen, USA) and (iv) CMRL+ broth: CMRL medium supplemented with lipids, amino acids and vitamins, developed in this work. Information of the defined media is available in Additional File (Supplementary Table S1).

Determination of Growth Rate

Figure 1A illustrates the protocol utilized for growth rate determination. Five hundred microliters of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinae* pre-inoculum culture were inoculated in 4.5 ml of complex Friis broth and in 4.5 mL of each defined media (YUS, YUSm, CMRL and CMRL+) in 15 mL tubes. Samples were incubated at 37°C under gentle agitation in a roller drum for 24 or 48 h.

Initially, the viability of the cells was visualized by a color change of the media, from red to yellow, by phenol red (20 mg L⁻¹) addition as pH indicator in all media (Friis, 1975). For cell concentration measurements, the cultures were submitted to flow cytometry assay (FCM). Cells were harvested by centrifugation at 3360 x g for 20 min, and washed with sterile 0.9 % saline solution three times. Afterwards, the cells were recovered and diluted with 0.9 % saline solution and submitted to flow cytometry (Guava EasyCyte, Millipore, Merck) for the determination of the cell concentration.

The setting was performed with sterile 0.9 % saline solution, combining Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) with green fluorescence (GRN). To adjust the threshold, the threshold marker in the plot was dragged until the unwanted events were eliminated below the marker, which should be positioned in the lower-left corner of the fluorescence plot.

The samples were vigorously agitated for seven seconds before being submitted to counting. To be acquired, the samples should undergo the default number of events (5000). Before the flow cytometry analysis, samples were diluted in order to maintain the rate number below 500 cell μL^{-1} . After sample acquisition, the count shown was multiplied by the dilution factor to obtain the correct concentration of cell μL^{-1} .

Evaluation of Mycoplasma Growth in Different Times of Cultivation

Assessment of both *Mycoplasma* spp. growth in different time points was performed with defined CMRL+ broth and Friis broth as a comparative medium. Five hundred microliters of each *Mycoplasma* spp. pre-inoculum were inoculated in 4.5 mL of Friis broth and CMRL+ broth in 15 mL tubes, and incubated at 37°C under gentle agitation in a roller drum. The growth was assessed, by flow cytometry, in the following times of cultivation: 0, 3, 9, 24 and 48 h. As seen in Figure 1B, at each time point, the samples had undergone the same procedure: cells were harvested by centrifugation at 3360 x g for 20 min, and washed with sterile 0.9% saline solution three times. Afterwards, the cells were recovered and diluted with 0.9% saline solution and submitted to flow cytometry. The setting was performed as described above. Each sample was vortexed for seven seconds before being submitted to count. The samples had undergone the default number of events to be acquired. After sample acquisition, the count was multiplied by the dilution factor to obtain the correct concentration of cell μL^{-1} . The experiment was performed with biological duplicate, and one independent culture was used for each time point, as all the 5 mL of culture were necessary to obtain enough cell quantity to enable the FCM counting.

Cell Viability Determination

As illustrated in Figure 2, 0.5 mL of each *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* grown in Friis broth were inoculated separately in 4.5 mL of the defined media: YUS, YUSm, CMRL and CMRL+. Cultures were incubated at 37°C under gentle agitation in a roller drum for 48 h. Thereafter, an aliquot of 0.5 mL of these cultures was used as pre-inoculum to be re-inoculated in 4.5 ml of Friis broth. These new cultures were incubated at 37°C under gentle agitation in a roller drum. Growth and viability was estimated from the metabolic activity through the color shift of the phenol red (20 mg L⁻¹) pH indicator.

Statistical Analysis

Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test was performed to compare statistical difference in growth amongst media and time of cultivation. The criterion for statistical significance was $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Transcriptional Response of *M. hyopneumoniae* Cultivated in CMRL+ Broth

Culture Conditions

M. hyopneumoniae was cultivated in Friis and in CMRL+ broth to assess the transcriptional response in the defined medium. The cultures (in Friis and CMRL+ broth) were performed in three different *in vitro* conditions: i) standard condition: bacteria grown in FRIIS broth or CMRL+ broth for 24 h at 37°C under gentle agitation in a roller drum; ii) oxidative stress condition: addition of 1% hydrogen peroxide to the standard cultures followed by incubation at 37°C for 15 min according to Schafer *et al.* (2007) (Schafer *et al.* 2007); and iii) heat shock condition: incubation of the standard cultures at 30°C for 2 h, and then

shifting to 42°C for 30 min (Madsen *et al.* 2006a). Figure 3 illustrates the conditions of cultivation until analysis of transcriptional response.

RNA Extraction

Cells of *M. hyopneumoniae* grown under the conditions described above (Figure 3), were harvested by centrifugation for 15 min at 10°C and 3360 x g from 20 mL of medium, and washed with DEPC water. The RNA extraction was performed using the TRIzol reagent (Invitrogen, USA), following manufacturer's specifications. The final pellet was recovered in 20 uL water RNase-free. The RNA was quantified by Qubit™ system (Invitrogen, USA). A total of 3 ug was treated with 40 U of DNase (Fermentas 50U/ul) in a 30 uL volume reaction at 37°C for 30 min, followed by 10 min at 65°C, with addition of EDTA. To assess the DNase treatment, PCR assay was performed using specific primers designed for *M. hyopneumoniae*. The quality of the RNA extracted was analyzed by electrophoresis agarose gel.

Target Selection and Oligonucleotides Design

The genes used to assess transcriptional regulation in CMRL+ broth were selected at considering several characteristics such as its position on genome, as well as its function. Genes at different positions and genome orientation of *M. hyopneumoniae* genome were selected. Oligonucleotides for PCR amplification of these genes were designed in Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, USA), from the nucleotide sequence of *M. hyopneumoniae* strain 7448 (GenBank access: NC_007332). Supplementary Table S2 shows the target genes and the oligonucleotides sequences and features.

cDNA Synthesis

The cDNA synthesis for each culture condition described above was performed in 20 uL reaction, containing 1 ug of RNA, 10 mmol L⁻¹ of dNTPs and 132.5 ng of randomic primer (pd(N)₆), heated at 65°C for 5 min and then incubated on ice for 2 min. Appropriate amounts of MMLV-RT buffer 5 X and DTT 0.1 mol L⁻¹ were then added and incubated for 2 min at 37°C. After the addition of 200 U of MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Invitrogen, USA), the reaction mix was incubated for 10 min at 25°C, followed by 50 min at 37°C and then 70°C by 15 min. As a negative control, the same reaction without the reverse transcriptase was performed simultaneously.

qPCR

Quantitative RT-PCR was performed using cDNA diluted five times previously prepared as template and Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, USA) on the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The qPCR reactions were carried out at 90°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min each. The specificity of the reaction and the absence of primer dimers were visualized using a melting curve analysis.

Amplification efficiency for each primer pair was calculated using the LinRegPCR software application (Ruijter *et al.* 2009). Relative expression of mRNA was calculated by the 2^{-ΔCt} method. The threshold cycle values were normalized to the reference gene MHP7448_333 (Madsen *et al.* 2008; Siqueira *et al.* 2014). The threshold cycle of each tested target represents the average of three reactions. Three independent biological and two technical replicates were performed for each target gene. Reverse transcription negative control for each synthesized cDNA and a non-template negative control were included to confirm the absence of DNA contamination.

Statistical Analysis

The data are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparison test was performed to analyze the differences in the relative expression amongst the culture condition within the same media. To compare the differences in the same culture condition between the two tested media a two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test was performed. The criterion for statistical significance was $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

RESULTS

Growth Rate in the Defined Media

Aiming to understand the growth requirements for *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*, the defined minimal medium established for *M. pneumoniae* (here named YUS) as well others minimal media were evaluated. The CMRL+ minimal broth used was developed in this work. Since the media used in our work differ on composition and component concentration, it was expected some difference in cell concentration in each of them.

As seen in Figure 4, for both *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*, all defined media but the CMRL+ presented a decreased cell density in culture when compared to the rich medium (Friss broth) after 24 h cultivation. Friis broth provided the highest cell concentration, followed by CMRL+ broth. *M. hyopneumoniae* cell densities in the defined media YUS, YUSm and CMRL were significantly lower compared to those in CMRL+ and Friss broth in 24 h of cultivation ($P < 0.01$) as well as in 48 h of cultivation ($P < 0.001$). The media with the lowest cell concentration was YUSm after 48 h of cultivation.

The same pattern was observed for *M. hyorhina*, as the cell densities in the YUS, YUSm and CMRL broth do not differ amongst each other ($P > 0.05$). Similar to *M. hyopneumoniae* cultivation, both Friis and CMRL+ media presented significant higher cell densities of *M. hyorhina* cell number ($P < 0.01$). YUSm allowed poorer growth of *M. hyorhina*, as the smallest cell concentration was determined in cultures using this medium. There was no significant difference between total number of cell in Friis and in CMRL+ broth for both bacteria. After 48 h of cultivation, the cell counting on Friis broth showed the highest quantity of cells (Figure 4). There is no significant difference when the total number of cells counted in the 24 h observation was compared with cell quantity after 48 h of cultivation in all the defined media tested: YUSm, YUS, CMRL and CMRL+ (Figure 4) for both mycoplasma species.

Cellular Viability

Aiming to access the cellular viability of both *Mycoplasma* spp., all different cultures were also analyzed by the color shift of phenol red pH indicator present in the media (see Supplementary Table S1). Non-inoculated medium presents the pH around 8.2 and a red color. During mycoplasma growth, its metabolites cause medium acidification, decreasing the pH to about 6.6 after 48 h cultivation. This pH alteration makes the color of the medium turn to yellow, which denotes bacteria growth (Friis 1975), as seen in Supplementary Figure S1a. Incubation of both *Mycoplasma* spp. in YUS, YUSm, CMRL and CMRL+ defined media for 48 h was evaluated for color changes. The alteration in color was only visualized in CMRL and CMRL+ media. Cultures in YUS and YUSm media changed the color only to orange that could represent slower cell multiplication.

To further analyze cell viability, 48 h-cultures from YUS, YUSm, CMRL and CMRL+ defined media were used as pre-inoculum to the Friis broth culture. Visual analysis of the Friis cultures showed the color shift to yellow only after 72 h of incubation for the CMRL and CMRL+ pre-inoculum media, and after 96 h of incubation for YUS and YUSm pre-inoculum media (Supplementary Figure S1b). Nevertheless, this color shift to yellow could also be due to accumulation of metabolites that acidify the media.

***Mycoplasma* spp. Growth at Different Time Points**

Comparing different time of cultivation in Friis broth, *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* presented no significant difference in growth when analyzed at 0 h, 3 h and 9 h of cultivation (Figure 5). The cell concentration variation was not significant in neither media for both species analyzed until nine hours of cultivation ($P > 0.05$). Cell concentration of both species cultivated in Friis broth increased significantly after 24 h. When comparing nine hours with 24 h of cultivation, it was observed a significant increase in cell concentration for both *Mycoplasma* spp. in Friis broth ($P < 0.0001$) (Figure 5). However, after this rise in cell concentration, a plateau was reached until 48 h of cultivation ($P > 0.05$).

In the CMRL+ broth, since the growth was slower, the variation in *M. hyopneumoniae* cell concentration was not significant in none of the times of cultivation assessed ($P > 0.05$) (Figure 5). *M. hyorhinis* presented a cell concentration significantly higher in 24 h and 48 h of cultivation when compared with the previous times of cultivation ($P < 0.0001$). There is no difference between 24 h and 48 h of cultivation of this species when cultivated in CMRL+ ($P > 0.05$). However, the cell concentration at 24 h and 48 h of cultivation of *M. hyorhinis* in Friis is significantly higher when compared with CMRL+ ($P < 0.0001$).

Gene Transcriptional Profile

Aiming to better observe the gene transcriptional profile in *M. hyopneumoniae* cultivated in CMRL+ broth, the expression of 18 different genes selected (Supplementary Table S2) and analyzed using qRT-PCR. cDNAs were synthesized from cells obtained after growth in two different media (Friss broth and CMRL+ broth), as well as in three different growth conditions (standard, heat shock and oxidative stress).

The analyzed genes belong to six different function classes: transcription; replication, recombination and repair; carbohydrate transport and metabolism; energy production and conversion; intracellular trafficking, secretion and vesicular transport and inorganic ion transport and metabolism. Moreover, their location and orientation are random, spread throughout the *M. hyopneumoniae* genome.

The transcriptional profile of *M. hyopneumoniae* was analyzed comparing the three conditions of cultivation (standard, heat shock and oxidative stress) in the same medium (Friss broth or CMRL+ broth) and some differences concerning gene regulation were observed (Table 1). Of the 18 genes analyzed, only the gene MHP7448_0627 showed no regulation in all tested media or culture condition. All the other 17 genes had transcriptional alteration in at least one of the stress conditions tested in CMRL+ broth. Meanwhile, in Friss broth, alteration in transcriptional level towards the stress conditions tested was detected for 14 genes. The three genes that had no transcriptional regulation when cultivated in Friss broth and exposed to stress conditions were MHP7448_0593, MHP7448_0603 and MHP7448_0009. Such genes codes to a ribonuclease, an inorganic pyrophosphatase and a hypothetical protein, respectively. However, in CMRL+ broth, all of

them respond to at least one of the stress conditions: two were down regulated in both stress conditions and MHP7448_0603 presented up-regulation in oxidative stress condition.

In the heat shock condition, the prevailing pattern of regulation differed between the two media. In the Friis broth cultures genes were mostly down regulated. However, the same set of genes were up regulated in CMRL+ broth cultures (Table 1). When submitted to oxidative stress, genes presented similar pattern of regulation between the two media, where 50 % and 72 % of the tested genes were down regulated in Friis and CMRL+ broth, respectively. Instead, some genes exhibit a completely different pattern of regulation towards the stress conditions in the two media. For instance, MHP7448_0290 (a hypothetical protein coding gene) is down regulated in Friis broth and up regulated in CMRL+ broth, when considering heat shock condition. Contrasting these results, the gene MHP7448_0691, which also encoded a hypothetical protein, maintained the same pattern of regulation in both media. Whereas the cultivation in Friis caused an overall down-regulation in the genes tested, in CMRL+ broth the response to stress had a distinct influence, causing different impact in gene expression: 16 genes were down-regulated and 12 genes were up-regulated (Table 1).

In a second analysis, relative expression of the genes from *M. hyopneumoniae* was compared when this bacterium was cultivated in Friis and in CMRL+ broth, using the same three parallel culture conditions. For evaluation of this experiment, the expression level presented in Friis broth in the analyzed conditions was considered as a control condition, to enable a comparison with CMRL+ broth and to evaluate the gene regulation in standard culture, heat-shock culture, and oxidative stress culture. These different media and culture conditions allowed three different comparisons: (a) relative expression of *M.*

hyopneumoniae in standard Friis cultivation was compared with relative expression of *M. hyopneumoniae* in standard CMRL+ cultivation; (b) relative expression after heat shock treatment in Friis compared with relative expression after heat shock treatment in CMRL+, and (c) relative expression after oxidative stress treatment when cultivated in Friis broth compared with relative expression after oxidative stress treatment when cultivated in CMRL+ broth.

These comparisons revealed changes in expression level in the different media and the results are summarized in Table 1 and illustrated in Figure 6. Fifteen genes (83 % of the tested genes) were differentially expressed in the heat shock condition and all of them were up-regulated in the CMRL+ medium, when compared to Friis broth. Analyses of the 18 genes under standard condition revealed that 11 (61%) of them showed differential expression, being up regulated in CMRL+ medium. However, in oxidative stress condition only two genes showed different pattern of gene expression and both were down regulated in CMRL+ medium.

The cultivation of *M. hyopneumoniae* in CMRL+ medium also represents a nutritional stress condition, as the CMRL+ is a minimal medium even with the supplementation, and therefore is not rich as the Friis broth. Interestingly, as seen in Figure 6, nine (50 %) of the tested genes were up regulated in the heat shock condition as well as in the standard cultivation in CMRL+ medium.

DISCUSSION

In attempt to find a defined medium that could be used as manipulative tool for *Mycoplasma* research, four different media were tested and compared to reference complex medium Friis, and some differences concerning the growth rate and viability of *M.*

hyopneumoniae and *M. hyorhinis* were observed. Also, the presence of gene regulation was shown when *M. hyopneumoniae* was cultivated in complex Friis broth, as well as in the defined medium developed in this work, CMRL+, in response to stress conditions.

The absence of significant difference between the total number of cell in 24 h and 48 h of cultivation of both species in all the defined media tested can be justified by the fact that these media are defined as maintenance media. As seen in Figure 4, the composition of the media influences directly the growth rate. The CMRL+, developed in this work, is the defined minimal broth with the best growth rate, resembling the Friis broth's, even though can be considered a maintenance broth, probably due to its relatively more complete composition.

Since requirements for mycoplasmal growth are not yet fully understood, some previous studies have been performed in attempt to determine nutritional requirements of *Mycoplasma* spp. Glucose and arginine are believed to be the primary carbon and energy source (Stemke and Robertson 1990), so *M. hyopneumoniae* growth curve was analyzed towards supplementation of the media with growing glucose concentration. However, the increase in the concentration of glucose did not change the growth curve of *M. hyopneumoniae* (Cook *et al.* 2016). Similar effects in the *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* growth after glucose and arginine supplementation were also observed by Stemke and Robertson (1990). In summary, the alteration of concentration of these components did not increase the growth rate nor the highest titer obtained (Stemke and Robertson 1990).

Another component rather analyzed was cholesterol, which is important for the membrane synthesis, essential for growth of most mycoplasmas (Razin 1969). Knowing that the serum

component of the mycoplasma complex medium is basically the only source of cholesterol, this component requirement was assessed by analyzing the growth in a serum-free medium with cholesterol supplementation (Razin and Tully 1970). All the *Mycoplasma* spp. analyzed in the study, except for three species (*Mycoplasma laidlawii*, *Mycoplasma granularum* and *Mycoplasma* sp. strain S-743), revealed a growth response to rising concentrations of cholesterol in the serum-free medium (Razin and Tully 1970). With the same aim, Rodwell and Abbot (1961) also assessed the role of cholesterol, glycerol and long-chain fatty acids in the nutrition of *Mycoplasma mycoides*. The observations suggested that deficit of glycerol, cholesterol and other lipids precursors could cause unbalanced growth, leading to death of viable cells and lysis (Rodwell and Abbot 1961).

Moreover, little is known about the nutritional requirements of mycoplasma towards nucleic acids and their constituent parts. Therefore, its effect on mycoplasma growth was evaluated (Razin and Knight 1960), and revealed that the concomitant addition of suitable concentrations of DNA and RNA allowed growth. It was also shown that high concentrations of RNA inhibit growth, which was overcome by raising the concentration of DNA, proving a mutual antagonism role of DNA and RNA upon growth (Razin and Knight 1960).

Our results demonstrated that YUS and CMRL broth showed differences in cell concentration, although not significantly, and further analyses of media composition between these two broths revealed interestingly differences. The major nutritional difference between CMRL and YUSm broth is how the nucleotides are provided. YUSm broth provides the nucleobase, whereas CMRL broth provides deoxyribonucleoside. The way the nucleotides are provided might be a reason why CMRL, despite not significantly, provides a higher growth rate than YUS and YUSm, as well as why CMRL+ provides the

highest growth rate amongst the defined media tested. Moreover, comparing the media composition (Supplementary Table S1) it is possible to observe that YUSm broth provides more lipids and a higher concentration of amino acids than CMRL, whereas CMRL broth provides more vitamins, basal components, like inorganic salts, and other components, such as NAD and FAD. Also, the only carbon source in the CMRL broth is glucose, whereas the YUSm broth, besides glucose, provides glycerol as an alternative carbon source. The results found in Figure 4 suggest that neither YUS nor CMRL (and its respective modifications) culture media provide nutritional components necessary for *M. hyopneumoniae* or *M. hyorhinae* growth when compared with Friis broth. Similar results were previously demonstrated by Bertin *et al.* (2013), who showed that, although CMRL contain all components to support cellular metabolism, it was unable to sustain *M. mycoides* growth and a further decrease in the number of viable cells was observed (Bertin *et al.* 2013). Other study has also shown that different media composition resulted in different growth rates, not only for *M. hyopneumoniae*, but also for *M. hyorhinae* and *M. flocculare* cultures (Ferrarini *et al.* 2016). Therefore, we developed the CMRL+ medium aiming to provide all the components for growth of these bacteria. The CMRL+ is the CMRL broth supplemented with the lipids, vitamins and amino acids that lack in CMRL broth and are present in the YUSm broth. This supplementation makes this medium nutritionally more complete, possibly justifying a better growth rate found in Figure 4.

Interestingly, data in Figure 4 showed that the cell concentration is similar for both *Mycoplasma* spp. tested in each media. The comparisons of total cell number from *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinae*, in the same media, demonstrated no differences in the cell count after 24 h of cultivation as well as in 48 h ($P > 0.05$). However, previous reports described that, when used for diagnostic purposes, *M. hyorhinae* overgrows in Friis medium

from field samples (Cook *et al.* 2016), and its presence can prevent the isolation of another *Mycoplasma* spp., mainly *M. hyopneumoniae* (Friis 1971; Zimmerman *et al.* 2012; Cook *et al.* 2016). This difference is reported when both *Mycoplasma* spp. are co-cultivated with diagnostic proposes, requiring time of incubation from four to five days. Therefore, the cultivation conditions used in the present study, such as gentle agitation in roller drum, the cultivation of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* separately, the lower time of incubation (two days) and the fact that pure cultures were used may justify the similar growth rate found between the two species.

The composition of the media also caused an impact on cell viability. The lower cell quantity in YUS and YUSm broth may qualify as a reason why the cultures of these media showed a slower shift in media color, when compared with CMRL and CMRL+ (Supplementary Figure S1b), presenting only an orange color. According to Razin (1994), it is necessary at least 100 to 1,000 cells for mycoplasma growth be visually detected in culture (Razin 1994). Therefore, mycoplasma cells may still be present in these media, but in a too low concentration to enable a regular growth, visualized by medium color change. Moreover, it is possible that the supplementation of CMRL (CMRL+) allows a basal cell proliferation, but after some time, compounds that were initially present are no longer available. Nevertheless, these results demonstrated the presence of viable mycoplasma cells in all tested media.

When comparing the different times of cultivation, the small growth of both species in Friis broth until nine hours of cultivation could be justified by the long duplication time of *Mycoplasma* spp., when compared to other bacteria. The duplication time is approximately ten hours for *M. mobile* (Jaffe *et al.* 2004), about eight hours for *M. pneumoniae* (Yus *et al.*

2009), from four to seven hours for *M. hyorhinis*, depending on the strain (Gardella and Delgiudice 1995), and *M. hyopneumoniae* duplication time varies from five to eight hours, depending on the media composition (Calus *et al.* 2010). As seen in Figure 5, after nine hours of cultivation, the cell concentration increased significantly, reaching a plateau by the end of 48 h of cultivation. Cook *et al.* (2016) reported that cultures also reached a maximum viability at approximately 60 h of incubation. However, after this time an exponential decrease in cell concentration was observed (Cook *et al.* 2016).

The slight decrease observed in cell concentration at both species cultures with three hours of cultivation in the CMRL+ broth could be due to the nutritional stress caused by this defined medium. Though the knowledge about mycoplasma cells adaptation in *in vitro* cultivation are scarce, our results suggest that the mycoplasmas tested could need some time to adapt to this new environment (the defined media), and in meantime, they could be damaged or even lysed or can no longer be viable.

Gene regulation in *M. hyopenumoniae* is poorly understood and up until now it is related to few transcription regulators, presence of putative sRNAs and up or down expression of some genes in different stress conditions (Madsen *et al.* 2006a; Schafer *et al.* 2007; Siqueira *et al.* 2016).

Up till now, gene regulation analysis in *M. hyopneumoniae* was performed mainly using complex rich medium. As the developed CMRL+ media showed similar mycoplasma multiplication compared to Friis broth, we decided to assess whether there is gene regulation in this maintenance medium.

The greater number of genes showing transcriptional alteration in at least one of the stress conditions tested when *M. hyopneumoniae* was cultivated in CMRL+ broth could suggest that genes alter their transcriptional levels more promptly when cultivated in this broth.

This could be due to the dual stress caused by the combination of nutrients deprivation in CMRL+ broth plus heat shock or oxidative stress, causing a greater impact in *M. hyopneumoniae*, which responds by altering its gene expression.

In our work, it was demonstrated that *M. hyopneumoniae*, besides responding to heat shock and oxidative stress, can also respond to nutritional stress at the transcriptional level, enforcing the fact that the composition of the media can influence the profile of gene expression. The deprivation of some nutrient or even the accumulation of metabolites could trigger, through a yet unknown mechanism, a shift in the transcriptional profile of some genes.

Also, detailed analysis revealed some interesting features for some of the studied genes. The gene MHP7448_0637, which encodes the transcription antitermination nusG, is the only gene with differential expression in all the culture conditions tested (Table 1). Its down-regulation in CMRL+ media during oxidative stress condition could indicate that the cell can focus its entire energy on remaining viable and not on cell division. Gene MHP7448_0476 is differentially expressed in both stress situations, but not in the control condition. And two other genes with no function assigned, MHP7448_0646 and MHP7448_0009, have no alteration in gene expression regardless of the culture condition tested ($P > 0.05$).

The *in vitro* oxidative stress condition for *M. hyopneumoniae* showed that only two genes were differentially expressed in CMRL+ broth, compared to the expression in Friis broth. In bacteria, hydrogen peroxide toxicity is attributable primarily to DNA damage that upon interaction with free cellular iron, forms hydroxyl radicals that can react with DNA causing DNA modifications and even strand breaks (Gusarov and Nudler 2005). The mechanisms used by *M. hyopneumoniae* to circumvent the presence of these radicals are not entirely

known and only few studies have been made in attempt to understand it. However, *M. hyopneumoniae* seems to react to oxidative stress through unknown mechanisms, altering its transcriptional profile. One of the few studies about this response performed a global transcriptional analysis of *M. hyopneumoniae* after hydrogen peroxide exposure (Schafer et al. 2007). Schafer *et al.* (2007) demonstrated that 38 genes, which represent 6 % of the total genes from the genome, had differential expression, 13 of them showed higher transcript level and 25 presented lower transcript level. Nevertheless, oxidative stress seems to be less detrimental, since only two of the analyzed genes in the present work were differentially expressed upon this condition.

The results illustrated on Figure 6 demonstrated that the heat shock stress condition caused a greater impact on gene expression in *M. hyopneumoniae*. Organisms respond to sudden increase in temperature by synthesizing in a transient, but massive manner, a set of heat shock proteins. Previous researches have suggested that this response is also characterized by enhanced reliance on glycolysis, which provides energy generation (Dascher *et al.* 1990; Plesofsky *et al.* 2016). This could justify the larger number of genes with altered relative expression when submitted to this stress condition, comparing the relative expression between the two media. However, the response to heat shock on mycoplasma, particularly at the transcriptional level, is poorly understood. In attempt to understand this process, a transcriptional profiling during heat shock stress using *M. hyopneumoniae* showed that 91 genes, which represent 14 % of the total genes from the genome, undergo significant transcriptional change in response to a shift in temperature (Madsen *et al.* 2006a). Therefore, as previously reported by Madsen *et al.* (2006), it is possible to suggest that *M. hyopneumoniae* also responds to temperature alterations, by modifying transcriptional activities of some genes through unknown mechanisms as suggested previously.

Taken together, these results demonstrate that all the defined media tested were able to maintain cell concentration and cellular viability and, among them, CMRL+ developed in this present study is the most suitable, even though it's considered a maintenance broth, unlike the complex Friis broth. CMRL+ provided a growth rate resembling the complex broth, in the tested conditions, and showed to have gene expression regulation in response to its composition and to the culture conditions tested. Therefore, this medium can be used as a tool that can be controllably manipulated enabling the definition of mycoplasmal nutritional requirements and metabolic pathways as well as genetic analysis, such as gene regulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. CAPES-Biologia Computacional (Process number: 23038.010043/2013-02) and MCTI/CNPq/ Universal (Process number: 445228/2014-8). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

REFERENCES

Baseman, J.B. and Tully, J.G. (1997) Mycoplasmas: Sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging Infectious Diseases* **3**, 21-32.

Bertin, C., Pau-Roblot, C., Courtois, J., Manso-Silvan, L., Thiaucourt, F., Tardy, F., Le Grand, D., Poumarat, F. and Gaurivaud, P. (2013) Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp *mycoides*. *Plos One* **8**, 9.

Calus, D., Maes, D., Vranckx, K., Villareal, I., Pasmans, F. and Haesebrouck, F. (2010) Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *Journal of Microbiological Methods* **83**, 335-340.

Cattani, A.M., Siqueira, F.M., Guedes, R.L.M. and Schrank, I.S. (2016) Repetitive Elements in *Mycoplasma hyopneumoniae* Transcriptional Regulation. *PLOS ONE* **11**, e0168626.

Citti, C. and Blanchard, A. (2013) Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology* **21**, 196-203.

Cook, B.S., Beddow, J.G., Manso-Silvan, L., Maglennon, G.A. and Rycroft, A.N. (2016) Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* **195**, 158-164.

Dascher, C.C., Poddar, S.K. and Maniloff, J. (1990) Heat-Shock Response In Mycoplasmas, Genome-Limited Organisms. *Journal of Bacteriology* **172**, 1823-1827.

Ferrarini, M.G., Siqueira, F.M., Mucha, S.G., Palama, T.L., Jobard, E., Elena-Herrmann, B., Vasconcelos, A.T.R., Tardy, F., Schrank, I.S., Zaha, A. and Sagot, M.F. (2016) Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. *Bmc Genomics* **17**, 20.

Friis, N.F. (1971) Selective Medium for *Mycoplasma Suiipneumoniae*. *Acta Veterinaria Scandinavica* **12**, 454.

Friis, N.F. (1975) Some Recommendations Concerning Primary Isolation of *Mycoplasma Suiipneumoniae* and *Mycoplasma Flocculare* - Survey. *Nordisk Veterinaer Medicin* **27**, 337-339.

Gardella, R.S. and Delgiudice, R.A. (1995) Growth of *Mycoplasma Hyorhinis* Cultivar-Alpha On Semisynthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1976-1979.

Gardner, S.W. and Minion, F.C. (2010) Detection and quantification of intergenic transcription in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology-Sgm* **156**, 2305-2315.

Greenbergofrath, N., Terespolosky, Y., Kahane, I. and Bar, R. (1993) Cyclodextrins as Carriers of Cholesterol and Fatty-Acids in Cultivation of Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 547-551.

Gusarov, I. and Nudler, E. (2005) NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13855-13860.

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.G., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H.C. and Church, G.M. (2004) The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Research* **14**, 1447-1461.

Kobisch, M. and Friis, N.F. (1996) Swine mycoplasmoses. *Rev sci tech* **15**, 6.

Madsen, M.L., Nettleton, D., Thacker, E.L., Edwards, R. and Minion, F.C. (2006a) Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infection and Immunity* **74**, 160-166.

Madsen, M.L., Nettleton, D., Thacker, E.L. and Minion, F.C. (2006b) Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology-Sgm* **152**, 937-944.

Madsen, M.L., Puttamreddy, S., Thacker, E.L., Carruthers, M.D. and Minion, F.C. (2008) Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infection and Immunity* **76**, 658-663.

Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M. and Mahairas, G.G. (2004) The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of Bacteriology* **186**, 7123-7133.

Oneal, M.J., Schafer, E.R., Madsen, M.L. and Minion, F.C. (2008) Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. *Microbiology-Sgm* **154**, 2581-2588.

Plesofsky, N., Higgins, L., Markowski, T. and Brambl, R. (2016) Glucose Starvation Alters Heat Shock Response, Leading to Death of Wild Type Cells and Survival of MAP Kinase Signaling Mutant. *Plos One* **11**, 31.

Razin, S. (1969) Structure and Function in *Mycoplasma*. *Annual Review of Microbiology* **23**, 317.

Razin, S. (1994) DNA Probes and PCR in Diagnosis of Mycoplasma-Infections. *Molecular and Cellular Probes* **8**, 497-511.

Razin, S. and Knight, B. (1960) The Effects of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid on the Growth of *Mycoplasma*. *Journal of General Microbiology* **22**, 504-519.

Razin, S. and Tully, J.G. (1970) Cholesterol Requirement of Mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* **102**, 306-310.

Razin, S. and Tully, J.G. (1995) *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. San Diego, California: Academic Press, INC.

Rodwell, A.W. and Abbot, A. (1961) Function of Glycerol, Cholesterol and Long-Chain Fatty Acids in Nutrition of *Mycoplasma Mycoides*. *Journal of General Microbiology* **25**, 201-214.

Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B. and Moorman, A.F.M. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* **37**, 12.

Schafer, E.R., Oneal, M.J., Madsen, M.L. and Minion, F.C. (2007) Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology-Sgm* **153**, 3785-3790.

Siqueira, F.M., de Moraes, G.L., Higashi, S., Beier, L.S., Breyer, G.M., de Sá Godinho, C.P., Sagot, M.-F., Schrank, I.S., Zaha, A. and de Vasconcelos, A.T.R. (2016) *Mycoplasma* non-coding RNA: identification of small RNAs and targets. *BMC Genomics* **17**, 743.

Siqueira, F.M., Gerber, A.L., Guedes, R.L.M., Almeida, L.G., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T.R. and Zaha, A. (2014) Unravelling the Transcriptome Profile of the Swine Respiratory Tract Mycoplasmas. *Plos One* **9**, 12.

Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barre, A. and Blanchard, A. (2007) Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology* **158**, 754-766.

Stemke, G.W. and Robertson, J.A. (1990) The Growth-Response Of *Mycoplasma-Hyopneumoniae* and *Mycoplasma-Flocculare* Based upon ATP-Dependent Luminometry. *Veterinary Microbiology* **24**, 135-142.

Thacker, E.L. (2004) Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* **12**, 252-254.

van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L. and Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 275-293.

Vasconcelos, A.T.R., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G.P., Almeida, R., Alves, L., Assuncao, E.N., Azevedo, V.A.C., Bogo, M.R., Brígido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., Cascardo, J.C.D., 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.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S.A., Frias, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimares, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F.A., Lopes, M.I., Loreto, E.L.S., Madeira, H.M.F., Manfio, G.P., Maranhao, A.Q., Martinkovics, C.T., Medeiros, S.R.B., Moreira, M.A.M., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolas, M.F., Oliveira, S.C., Paixao, R.F.C., Pedrosa, F.O., Pena, S.D.J., Pereira, M., Pereira-Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C.M., Santos, F.R., Schmitt, R., Schneider, M.P.C., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanez, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares,

C.M.A., Souza, K.R.L., Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B.R., Teixeira, S.M.R., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J.G. and Zaha, A. (2005) Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology* **187**, 5568-5577.

Yus, E., Maier, T., Michalodimitrakis, K., van Noort, V., Yamada, T., Chen, W.H., Wodke, J.A.H., Guell, M., Martinez, S., Bourgeois, R., Kuhner, S., Raineri, E., Letunic, I., Kalinina, O.V., Rode, M., Herrmann, R., Gutierrez-Gallego, R., Russell, R.B., Gavin, A.C., Bork, P. and Serrano, L. (2009) Impact of Genome Reduction on Bacterial Metabolism and Its Regulation. *Science* **326**, 1263-1268.

Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J. and Stevenson, G.W. (2012) *Diseases of Swine*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc.

Figures:

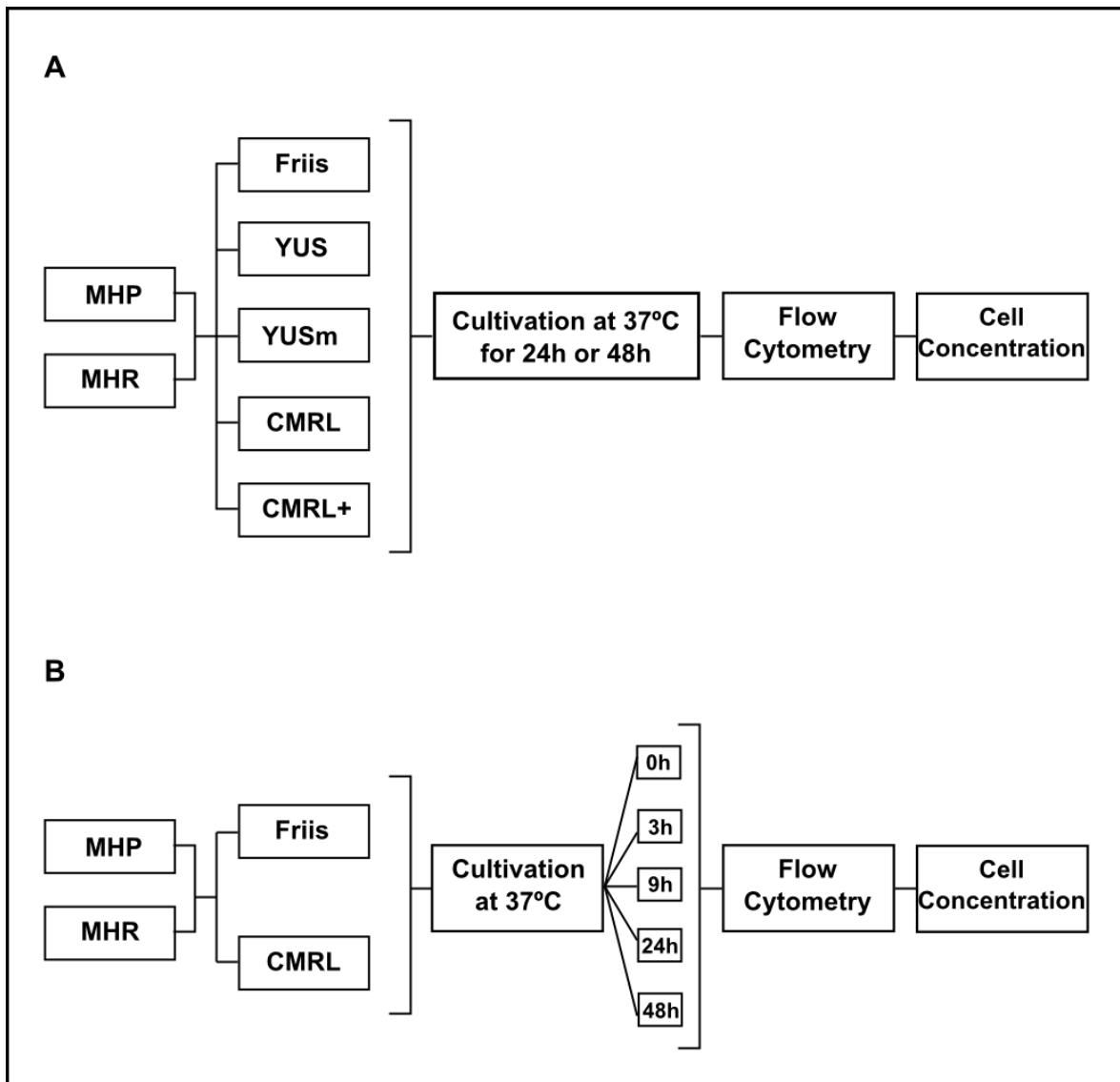


Figure 1: Schematic representation of sample cultivation and processing. A: workflow of procedures to assess the growth rate in all the defined media to compare with complex medium. B: assessment of growth in different times of cultivation of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* in Friis and CMRL+ broth. MHP: *M. hyopneumoniae*; MHR: *M. hyorhinis*.

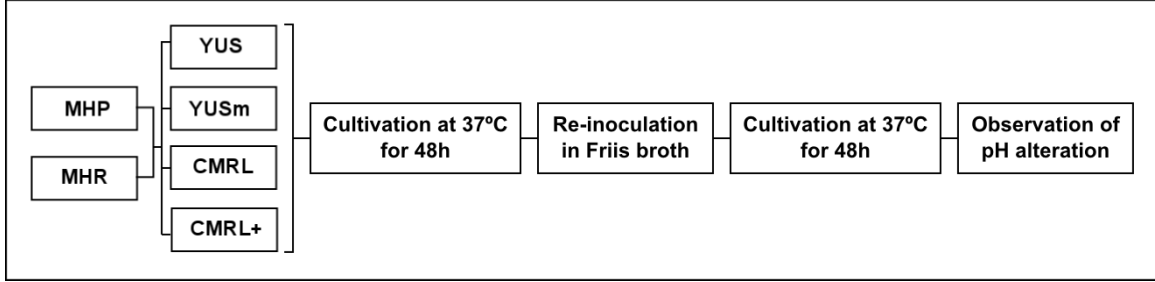


Figure 2: Schematic representation of viability test protocol. Indicating the species and media utilized, pH alteration was seen through color shift of the media. MHP: *M. hyopneumoniae*; MHR: *M. hyorhinis*.

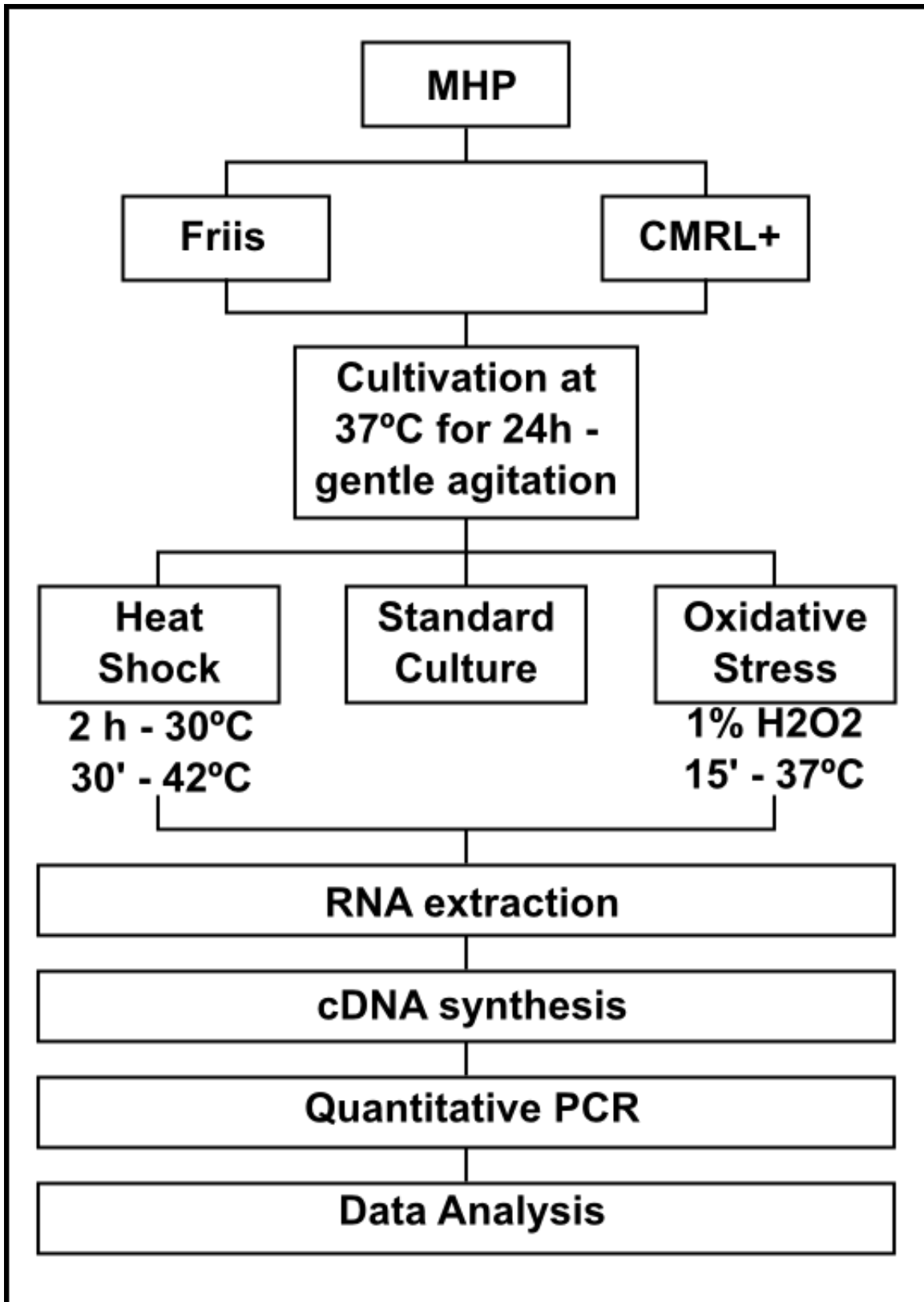


Figure 3: Schematic representation of procedures to assess gene regulation in CMRL+ and Friis broth. MHP: *M. hyopneumoniae*; MHR: *M. hyorhinis*.

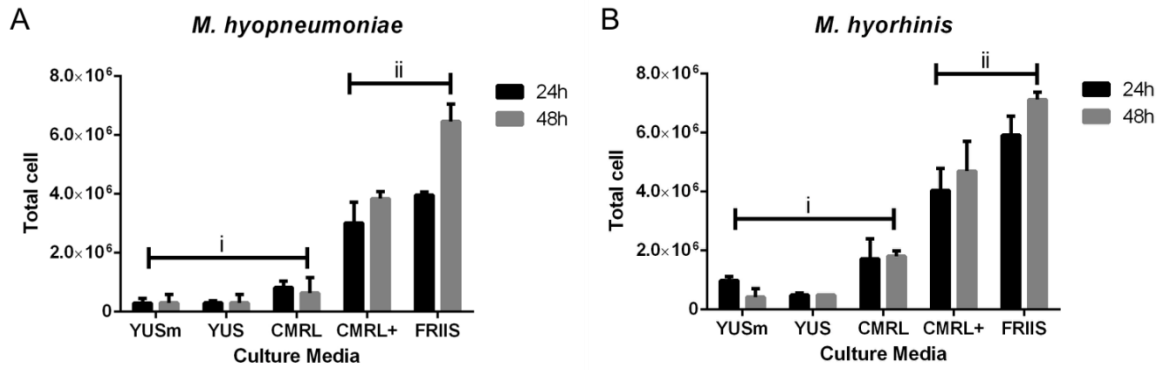


Figure 4: Total number of cell in each media, by Flow Cytometry Assay. A: total number of cell of *M. hyopneumoniae* in the defined media as well as in the complex medium. B: total number of cell of *M. hyorhinis* in the defined media as well as in the complex medium. The culture media (i) had no significant difference amongst each other and are statistically different from the media (ii). Twenty-four hours of cultivation is represented by the black bars and 48 h of cultivation is represented by the gray bars. Data sowed as mean±SEM.

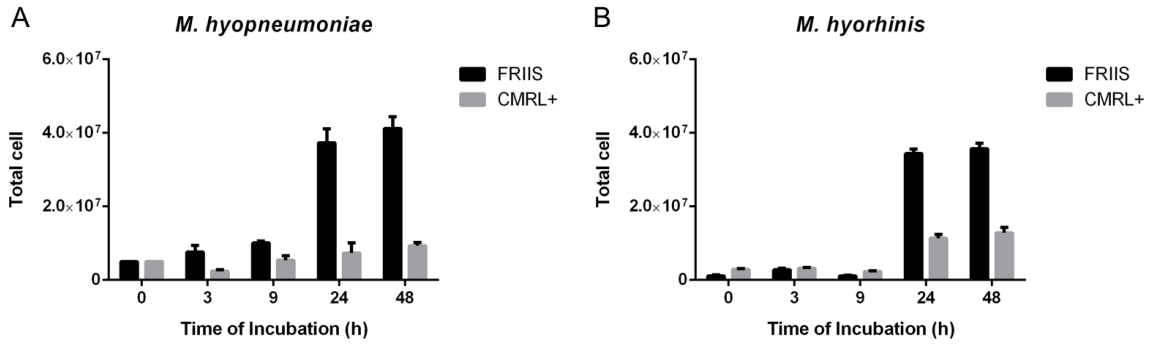


Figure 5: Total cell number in the different time points analyzed. A: total cell number in 5 mL culture of *M. hyopneumoniae* in Friis (black bars) and CMRL+ (gray bars). B: total cell number in 5 mL culture of *M. hyorhinis* in Friis (black bars) and CMRL+ (gray bars). One independent culture was used to assess the total number of cell at each time point.

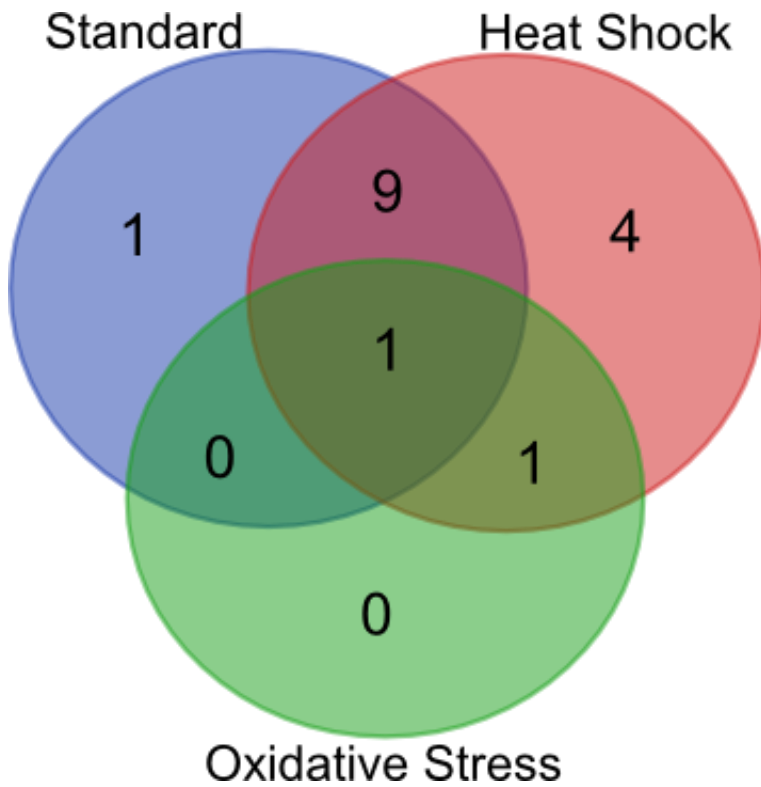


Figure 6: Venn diagram showing the distribution of genes differentially expressed in the three different culture conditions. Venn diagram identifying the total number of common and exclusive genes differentially expressed in standard, heat shock and oxidative stress conditions.

Table 1: Differential expression of genes in the different culture media and conditions.

Gene ID	Product	Friis broth		CMRL+ broth		CMRL+ broth vs Friis broth		
		HS	OS	HS	OS	ST	HS	OS
MHP7448_0249	DNA Processing Protein (<i>smf</i>)	-	down	up	-	up	up	-
MHP7448_0637	Transcription Antitermination (<i>nusG</i>)	-	up	up	down	up	up	down
MHP7448_0627	ABC Transporter ATP-binding	-	-	-	-	up	up	-
MHP7448_0476	Conserved Hypothetical Protein	up	-	up	down	-	up	down
MHP7448_0603	Inorganic Pyrophosphatase (<i>ppa</i>)	-	-	-	Up	-	up	-
MHP7448_0398	Ribonuclease III (<i>rnc</i>)	-	down	up	down	-	up	-
MHP7448_0691	Hypothetical Protein	-	down	-	down	up	-	-
MHP7448_0428	Transketolase (<i>tkt</i>)	down	down	up	down	up	up	-
MHP7448_0086	Preprotein Translocase (<i>secA</i> subunit)	-	down	up	down	up	up	-
MHP7448_0438	3-hexulose-6-phosphate Synthase (<i>sgaH</i>)	down	down	-	Up	up	up	-
MHP7448_0593	Ribonuclease (<i>rnhB</i>)	-	-	down	down	up	up	-
MHP7448_0290	Hypothetical Protein	down	-	up	down	up	up	-
MHP7448_0100	Hypothetical Protein	down	down	-	down	-	up	-
MHP7448_0403	ATP-dependent Helicase (<i>pcrA</i>)	down	down	down	Up	-	up	-
MHP7448_0116	Pyruvate Dehydrogenase (<i>pdhB</i>)	down	-	-	down	up	up	-
MHP7448_0581	Exonuclease	up	-	up	down	up	up	-
MHP7448_0646	Conserved Hypothetical Protein	down	down	up	down	-	-	-
MHP7448_0009	Conserved Hypothetical Protein	-	-	down	down	-	-	-

HS: heat shock; OS: oxidative stress; ST: standard; up: up-regulation; down: down-regulation.

4.2. ARQUIVOS SUPLEMENTARES DO MANUSCRITO

Supplementary Table S1: Information of the composition of the defined media tested.

Additional File: Media Composition

Component	YUS Concentration	YUSm Concentration	CMRL Concentration	CMRL+ Concentration
Basal				
Na ₂ HPO ₄	2mM	2mM	1.01mM	1.01mM
NaHCO ₃	-	-	26.19mM	26.19mM
NaCl	100mM	100mM	117mM	117mM
KCl	5mM	5mM	5.33mM	5.33mM
CaCl ₂	0.2mM	0.2mM	1.8mM	1.8mM
MgSO ₄	0.5mM	0.5mM	0.813mM	0.813mM
sodium acetate-3H ₂ O	-	-	0.61mM	0.61mM
sodium glucuronate-3H ₂ O	-	-	0.0178mM	0.0178mM
Carbon Source				
glucose	10g/L	10g/L	1g/L	1g/L
glycerol	0.5g/L	0.5g/L	-	25g/L
Vitamins				
spermine	0.1mM	0.1mM	-	100mM
nicotinic acid	1mg/L	1mg/L	0.025mg/L	0.025mg/L
thiamin	1mg/L	1mg/L	0.01mg/L	0.01mg/L
pyridoxal	1mg/L	1mg/L	0.025mg/L	0.025mg/L
thioctic acid	0.2mg/L	0.2mg/L	-	4.4g/L
riboflavin	1mg/L	1mg/L	0.01mg/L	0.01mg/L
choline	1mg/L	1mg/L	0.5mg/L	0.5mg/L
folic acid	1mg/L	1mg/L	0.01mg/L	0.01mg/L
coenzyme A/panthothenate	1mg/L	1mg/L	0.01mg/L	0.01mg/L
pyridoxine hydrochloride	-	-	0.025mg/L	0.025mg/L
ascorbic acid	-	-	0.284mM	0.284mM
i-inositol	-	-	0.05mg/L	0.05mg/L
biotin	-	-	0.01mg/L	0.01mg/L
niacinamide	-	-	0.025mg/L	0.025mg/L
para-aminobenzoic acid	-	-	0.05mg/L	0.05mg/L
Bases				
guanine	20mg/L	20mg/L	-	-
uracil	20mg/L	20mg/L	-	-
thymine	10mg/L	10mg/L	-	-
cytidine	20mg/L	20mg/L	-	-

adenine	20mg/L	20mg/L	-	-
thymine	-	-	10mg/L	10mg/L
2'deoxyadenosine	-	-	10mg/L	10mg/L
2'deoxyguanosine	-	-	10mg/L	10mg/L
2'deoxycytidine	-	-	10mg/L	10mg/L
5'-methyl-deoxycytidine	-	-	0.1mg/L	0.1mg/L
uridine 5'triphosphate	-	-	1mg/L	1mg/L

Lipids

cholesterol	20mg/L	20mg/L	0.2mg/L	14g/L
palmitic acid	10mg/L	10mg/L	-	7g/L
oleic acid	12mg/L	12mg/L	-	12mg/L
linoleic acid	10mg/L	10mg/L	-	10mg/L
BSA	2g/L	2g/L	-	2g/L

Amino Acids

alanine	4mM	4mM	0.281mM	0.281mM
arginine	4mM	4mM	0.332mM	0.332mM
aspartate	-	-	0.226mM	0.226mM
asparagine	4mM	4mM	-	-
cysteine	-	-	1.65mM	1.65mM
cystine	-	-	0.0833mM	0.0833mM
glutamate	-	-	0.51mM	0.51mM
glutamine	4mM	4mM	-	0.4M
glycine	4mM	4mM	0.667mM	0.667mM
histidine	4mM	4mM	0.0952mM	0.0952mM
isoleucine	4mM	4mM	0.153mM	0.153mM
leucine	4mM	4mM	0.458mM	0.458mM
lysine	4mM	4mM	0.383mM	0.383mM
methionine	8mM	8mM	0.101mM	0.101mM
phenylalanine	1mM	1mM	0.152mM	0.152mM
hydroxy L-proline	-	-	0.0763mM	0.0763mM
L-proline	4mM	4mM	0.348mM	0.348mM
serine	1mM	1mM	0.238mM	0.238mM
threonine	4mM	4mM	0.252mM	0.252mM
tryptophan	0.5mM	0.5mM	-	0.049mM
tyrosine	0.5mM	0.5mM	0.221mM	0.221mM
valine	8mM	8mM	0.214mM	0.214mM

Peptides

peptone	2.5g/L	-	-	-
---------	--------	---	---	---

Others

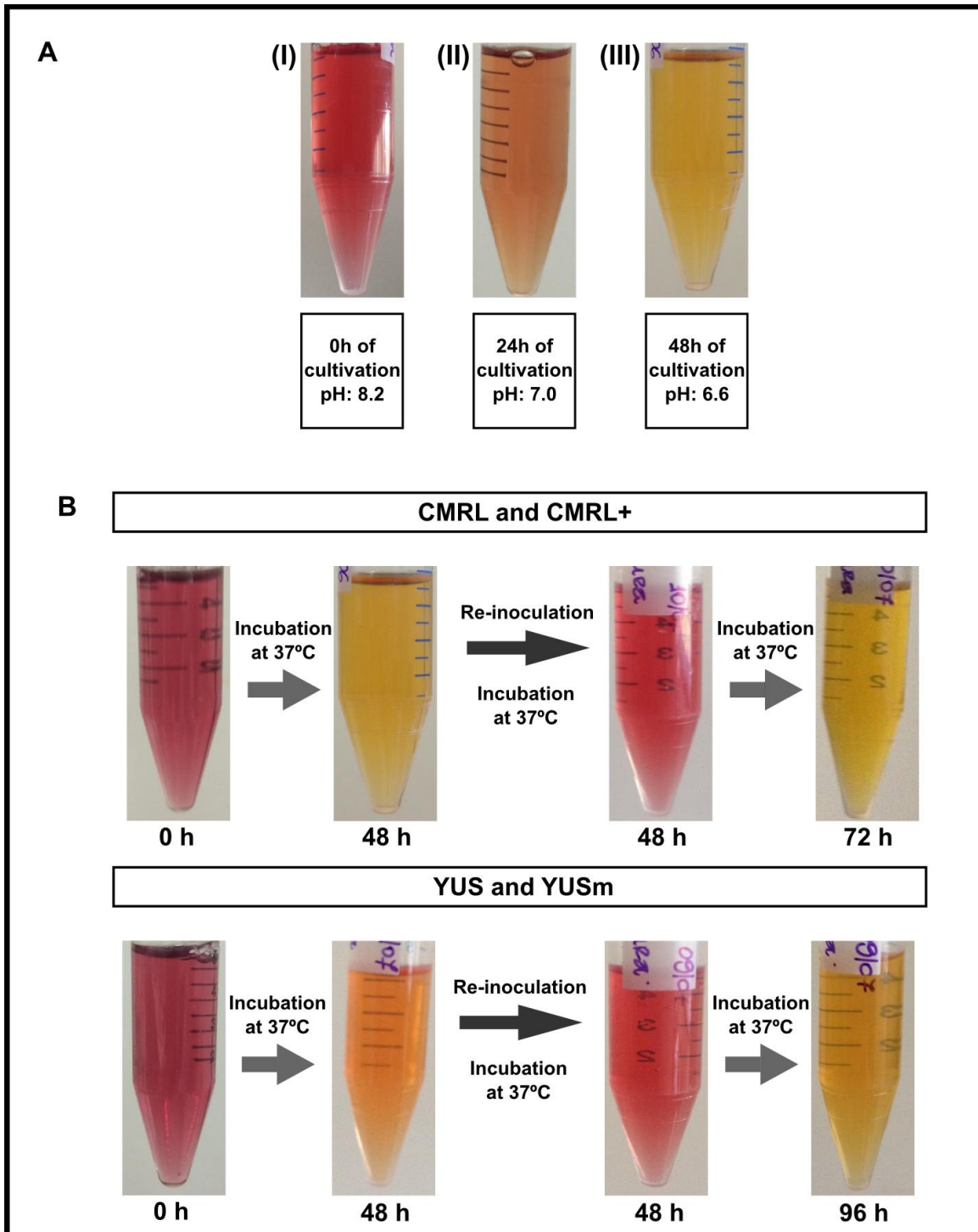
hepes	50mM	50mM	-	-
-------	------	------	---	---

phenol red	2.5mg/L	2.5mg/L	20mg/L	20mg/L
tween 80	-	-	5mg/L	5mg/L
NAD	-	-	7mg/L	7mg/L
FAD	-	-	1mg/L	1mg/L
NADH	-	-	1mg/L	1mg/L
glutathione (reduced)	-	-	10mg/L	10mg/L
co-carboxylase	-	-	1mg/L	1mg/L

Supplementary Table S2: Target genes and the oligonucleotides sequences and features used to assess transcriptional regulation.

Gene ID	Product	Primer Id.	Sequence (5' - 3')	Melting Temperature (°C)	Product Length (bp)
MHP7448_0476	conserved hypothetical protein	476F	GCCAAACTAGCAAATGAGTATGC	54.6	182
		476R	GAAGCCGAAAGTTGATGAAGTTG	54.7	
MHP7448_0009	conserved hypothetical protein	009F	CTGGTTTTGGGATTGGTGATG	54.2	173
		009R	GTAAGCCTCCCGATTTTCCCTAC	52.2	
MHP7448_0249	DNA processing protein	249F	CGGCAAATGGGATAGAAAATCC	54.2	186
		249R	GTGATCCACCTGATTTCCGAATTG	56.2	
MHP7448_0637	transcription antitermination	637F	CTTGTCGGGTCTCATGGTAGAGG	58.7	183
		637R	CCCAAATCATCAGAAAAAGGGC	55.0	
MHP7448_0627	ABC-transporter ATP-binding	627F	GGTGAAAAACAGAAAATTGCAC	51.5	172
		627R	CTTTTGGAATATGATGGCTTACG	52.1	
MHP7448_0603	inorganic pyrophosphatase	603F	GATTGAGATGGCGATGCTCTTG	56.1	155
		603R	CGGTAGTCATCATTATGGACACC	55.0	
MHP7448_0428	transketolase	428F	CCAACCTTGATTCCCCTCTTGAC	55.6	179
		428R	CGCCGATAATTGTTTTAATCTCG	52.4	
MHP7448_0398	ribonuclease III	398F	GAAATTCAACCCAAATTCGATCC	52.7	181
		398R	CCTTGATCCAATAAGATCGCCG	55.7	
MHP7448_0691	hypothetical protein	691F	CCGAGGGAGCGACCCGTATGAC	63.6	163
		691R	CCGCTTGCGTATTGACCAAATCC	58.9	
MHP7448_0086	translocase	086F	CTGGACGACAAGGTGATGTGGG	59.9	175
		086R	CCTTCGATTTTCTTTTGGGCTGC	57.2	
MHP7448_0438	3-hexulose-6-phosphate synthase	438F	CGCTGATTTTACCACCGTAATTTG	54.8	173
		438R	GCGGAACCCCTACCTCTTTTCAG	59.6	

MHP7448_0593	ribonuclease HII	593F	CCTTGAGATTTTCAAAAATTCCC	50.7	155
		593R	GAACCAGCAGGAAAAACAGC	54.8	
MHP7448_0581	5'-3' exonuclease	581F	GGGGAAATGACCTTTGCAGTTC	56.6	164
		581R	GAATCAGGAGGTTTTATTCGCC	56.0	
MHP7448_0116	pyruvate dehydrogenase	116F	CGAAACCGTTCTCGCAGTCG	58.7	179
		116R	GCGGCAATTAAGTCCCTTTG	55.2	
MHP7448_0290	hypothetical protein	290F	CAAACTTCTCAAATTCGGCAGG	55.3	151
		290R	GCTCCTTGACGGGCTTTTTCTTG	58.9	
MHP7448_0100	hypothetical protein	100F	CTTAGTGCCAAAAAATTGAACC	51.3	180
		100R	GTTAAGATAGCGTTGAGCCAAATC	54.2	
MHP7448_0403	ATP-dependent helicase	403F	CAAGCCTCTGATACTCGCAATC	55.6	181
		403R	CAAGACCTTTTGAGGAATGTACTG	53.7	
MHP7448_0646	conserved hypothetical protein	646F	CCAATTTATCACCAAACAAAACC	51.2	179
		646R	GGGGAAAAGGTAGAAAATATCG	51.6	



Supplementary Figure S1: Viability test by color shift of the media. A: expected color change of media, in an earlier inoculated medium (I), in alkalyne pH (around 8.2) the medium shows a red color, implying that there is no mycoplasma growth. Once mycoplasma starts to duplicate, its growth metabolites causes medium acidification (II), decreasing the pH to about 6.6 in 48 h cultivation (III). This pH alteration, seen by a color

shift from red to yellow denotes bacteria growth. B: viability test result. By the end of 48 h of cultivation, the alteration in color was only visualized in CMRL and CMRL+ media. After re-inoculation in Friis broth neither culture presented the expected color shift.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de meios de cultivo para micoplasmas é extremamente importante devido a relevância destes micro-organismos na patogênese de diversos animais. Em 1975, Friis padronizou um meio de cultivo complexo permitindo a multiplicação de várias espécies de micoplasma. Este meio de cultivo possibilitou o desenvolvimento de métodos de isolamento e diagnóstico de doenças causadas por micoplasma, como a pneumonia enzoótica suína, embora não permita análises gênicas e de rotas biossintéticas. Entretanto, os esforços investidos no desenvolvimento de meios de cultivo para micoplasma tem encontrado diversos obstáculos. Deste modo, a obtenção de um meio mínimo definido, que sustente o crescimento de micoplasmas, serviria como uma ferramenta controladamente manipulável, permitindo a investigação de requerimentos nutricionais, rotas metabólicas assim como análises genéticas.

Com o objetivo de elucidar os requerimentos para o crescimento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, meios de composição definida foram testados neste trabalho. Os meios definidos selecionados diferem quanto a sua composição e concentração de seus componentes, portanto seria esperada a detecção de uma diferença na concentração celular em cada meio, corroborando os dados de Ferrarini *et al.* (2016), que demonstraram que diferentes composições de meios resultam em diferentes taxas de crescimento não só em *M. hyopneumoniae*, mas também em *M. hyorhinis* e *M. flocculare*.

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram que o meio complexo Friis forneceu o maior número total de células de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, seguido pelo meio CMRL+. YUSm foi o meio que proporcionou menor quantidade de células após 48 h de cultivo para ambas as espécies. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferrarini *et al.* (2016), que demonstraram que a suplementação de meio YUS não permitiu proliferação celular de nenhuma das três espécies testadas (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*), apenas manteve a concentração e viabilidade celular por até cinco dias, quando repicadas para meio Friis. Quanto ao meio CMRL, este somente manteve a viabilidade de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* quando suplementado com peptona (Ferrarini *et al.*, 2016).

Nossos resultados indicam que, para ambas as espécies, somente o meio CMRL complementado (CMRL+) apresentou nível de crescimento adequado, quando comparado com o meio complexo Friis. Esse fato pode ser devido à composição do novo meio desenvolvido, pois este contém fontes de carbono alternativas, sendo suplementado com diferentes lipídeos, necessários para a síntese da membrana celular, com ácidos nucléicos que são fornecidos de forma para melhor assimilação pela célula, além de maior concentração de vitaminas.

Estudos anteriores foram realizados visando a determinação de requerimentos nutricionais de *Mycoplasma* e algumas de suas conclusões são reportadas a seguir.

Meio de composição rica e complexa contém soro animal, permitindo que este atue como fonte de colesterol e outros lipídeos. Considerando um meio mínimo definido, a demanda por esses nutrientes deve ser suprida por outras vias, uma vez que não se conhece a composição exata do soro, impedindo seu uso em meios definidos. Além disso, o crescimento de micoplasma em um meio sem soro pode sugerir uma independência do colesterol para seu crescimento. Entretanto, como o soro fornece outros nutrientes, como ácidos graxos, a ausência de crescimento em meio sem soro não significa que micoplasma seja dependente apenas de colesterol (Razin e Tully, 1970). Portanto, se faz necessário avaliar os requerimentos de colesterol, ácidos graxos e esterol de micoplasmas, para que seja corretamente suplementado no meio definido, sem soro. Razin e Tully (1970), a partir de um meio determinado como basal para o cultivo de *Mycoplasma*, adicionaram concentrações crescentes de colesterol e analisaram sua influência no crescimento dos organismos. Foi observado que apenas 7 % dos organismos testados não demonstraram alteração no crescimento em resposta ao aumento da concentração de colesterol, as demais espécies apresentaram crescimento ou apresentaram crescimento quase indetectável quando cultivadas em meio sem colesterol (Razin e Tully, 1970).

Resultados de um estudo realizado com *Mycoplasma mycoides* sugerem que a deficiência de colesterol, glicerol e de outros precursores causa um crescimento desequilibrado, o que resulta em morte e lise celular de organismos previamente viáveis (Rodwell e Abbot, 1961). Além disso, uma deficiência de ácido oleico influenciou negativamente a contagem de elementos viáveis. Entretanto, a ausência de ácido palmítico

não causou uma diminuição na detecção de elementos viáveis. Análises morfológicas desses organismos nas diferentes condições se mostrou alterada quando cultivados em meios sem glicerol, colesterol, ácido oleico e/ou ácido palmítico (Rodwell e Abbot, 1961). Ainda assim, mais estudos relativos aos efeitos da deficiência de ácidos graxos são necessários.

A possibilidade de a glicose atuar como um fator limitante do crescimento também foi investigada (Cook *et al.*, 2016). Após adição de concentrações crescentes de glicose em meio Friis, foi realizada a contagem de elementos viáveis. A curva de crescimento obtida não apresentou alterações, independentemente da concentração de glicose utilizada (Cook *et al.*, 2016). Também foi analisada a influência do pH, uma vez que foi sugerido que a diminuição da viabilidade quando o meio atinge coloração amarela seria devido à acidificação do pH (Friis, 1975). Cook *et al.*, (2016) observaram que a neutralização do pH resultou em uma pequena, embora não significativa, melhora na sobrevivência bacteriana em quatro a seis dias.

Pouco se sabe sobre a influência de ácidos nucléicos e seus constituintes sobre o crescimento de *Mycoplasma*, assim como seus requerimentos frente a estes compostos. O uso de um meio mínimo definido auxilia no estudo do efeito destes, entre outros componentes, no crescimento de micoplasma. Através do uso do meio Edward's modificado (Edward, 1947), o impacto dos ácidos nucléicos foi examinado por Razin e Knight, (1960b). Resultados mostraram que não há crescimento de *Mycoplasma laidlawii* em meio basal sem adição de nucleotídeos e que a adição concomitante em concentrações adequadas de DNA e RNA promoveu crescimento. Entretanto, adição de concentrações elevadas de RNA inibiu o crescimento, e esse efeito foi superado com a elevação da concentração de DNA (Razin e Knight, 1960b). Neste trabalho também foi analisada a influência da degradação dessas moléculas sobre a atividade promotora de crescimento das mesmas. A degradação de RNA a oligonucleotídeos não afetou significativamente sua atividade promotora de crescimento, causando inclusive um decréscimo nesta atividade. Já a degradação a nucleosídeo-5'-fosfato aboliu completamente a atividade promotora de crescimento. Misturas de purinas e pirimidinas se mostraram inativas na promoção de crescimento (Razin e Knight, 1960b). Esse fato pode justificar a baixa multiplicação bacteriana encontrada nos meios YUS e YUSm, uma vez que estes fornecem as bases

nitrogenadas como misturas de purinas e pirimidinas. Em um segundo estudo, Razin e Knight (1960) constataram que componentes fornecidos por DNA e RNA eram essenciais para *M. laidlawii* linhagem A, mas que, para *M. laidlawii* linhagem B e *M. mycoides* var. *capri* somente componentes fornecidos pelo DNA eram necessários (Razin e Knight, 1960a). Isto indica que necessidades nutricionais variam dentro do mesmo gênero, e que análises individuais para cada organismo são necessárias.

Os resultados apresentados na Figura 4 ainda demonstram uma concentração celular semelhante para ambas as espécies de *Mycoplasma* em cada meio testado no presente trabalho. A comparação do número total de células de *M. hyopneumoniae* com *M. hyorhinis* em cada meio de composição definida não apresenta diferença de contagem após 24 e 48 horas de cultivo. Entretanto, há relatos anteriores relativos a diferença de crescimento entre as duas espécies. No meio de cultivo Friis, quando usado para fins diagnósticos, há o aparente favorecimento do crescimento de *M. hyorhinis* em detrimento de *M. hyopneumoniae* (Cook *et al.*, 2016). A presença de *M. hyorhinis*, muitas vezes, pode inibir o crescimento de outras espécies colonizadoras do trato respiratório de suínos, como *M. hyopneumoniae* (Friis, 1971; Zimmerman *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2016). Essa diferença de crescimento é reportada quando as duas espécies são co-cultivadas, a partir de amostras de campo, com propósito diagnóstico, necessitando de um período de incubação de quatro a cinco dias, sem agitação. As condições de cultivo empregadas no presente trabalho, como cultivo em meio líquido com agitação leve e constante durante a incubação, cultivo individual de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, além de um período de incubação menor (até dois dias) e uso de culturas puras podem justificar a ausência de diferença entre as duas taxas de crescimento.

A análise do crescimento em diferentes tempos de incubação nos permite observar que até nove horas de cultivo não há uma mudança significativa na concentração celular em nenhuma das espécies em meio Friis (Figura 5). Esse fato é sustentado pelo período de duplicação relativamente longo de micoplasmas, quando comparado com o de outras bactérias. Enquanto *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* apresentam tempo de duplicação de aproximadamente 65 min, 30 min e 20 min (Nanninga *et al.*, 1979; Sordelli *et al.*, 1985; Osella *et al.*, 2014), o tempo de duplicação de *M. mobile* é de aproximadamente 10 horas (Jaffe *et al.*, 2004), *M. pneumoniae* tem tempo de

duplicação de cerca de 8 horas (Yus *et al.*, 2009), *M. hyorhinis* o tempo varia de 4 a 7 horas, dependendo da cepa analisada (Gardella e Delgiudice, 1995), e o tempo de duplicação de *M. hyopneumoniae* varia de 5 a 8 horas, de acordo com a composição do meio em que é cultivado (Calus *et al.*, 2010). Ao comparar a concentração celular entre nove horas e 24 h de cultivo em meio Friis observa-se aumento significativo da taxa de crescimento de ambas as espécies testadas. Esse pico de crescimento é seguido por uma fase estacionária, entre 24 e 48 horas de cultivo, representada por um platô.

O pequeno decréscimo na quantidade de células, de ambas as espécies, observado na contagem após três horas de incubação no meio CMRL+ pode ser devido ao estresse nutricional causado por este meio definido. Embora pouco se saiba a respeito da adaptação celular ao cultivo *in vitro*, nossos resultados sugerem que as espécies de *Mycoplasma* testadas necessitam de uma longa fase lag para se habituar a esse novo ambiente (meio definido), podendo sofrer danos, lise ou até mesmo perder a viabilidade, durante esse período de adaptação.

Embora as taxas de crescimento sejam semelhantes em ambos os meios, o meio Friis proporciona um maior crescimento, uma vez que é um meio rico em nutrientes e sabidamente sustenta o crescimento de *Mycoplasma*. Os resultados mostrados na Figura 4 ainda sugerem que nenhum dos meios definidos (YUS, CMRL e suas respectivas modificações) testados supre todas as necessidades nutricionais para o crescimento esperado de *M. hyopneumoniae* ou *M. hyorhinis* quando comparados com o meio Friis. Resultados semelhantes foram encontrados por Bertin *et al.* (2013), que relatam que o meio CMRL não foi capaz de sustentar o crescimento de *M. mycoides* subsp. *mycoides*, gerando um decréscimo na quantidade de células viáveis durante o período de incubação (Bertin *et al.*, 2013). O meio CMRL contém todos os componentes necessários para sustentar o metabolismo celular, porém não permite crescimento celular. Esse fato pode ser explicado pela baixa concentração de colesterol presente no meio e ausência de outros ácidos graxos, podendo resultar não só em lise celular, como também em inibição do crescimento. Portanto, uma versão do meio CMRL suplementada com lipídeos, vitaminas e aminoácidos, baseada nos constituintes presentes no meio YUSm e ausentes no meio CMRL comercialmente disponível, foi desenvolvida visando suprir essa demanda necessária para promover o crescimento. Essa suplementação torna o meio CMRL+

nutricionalmente mais completo, o que possivelmente justifica sua maior taxa de crescimento dentre os meios definidos testados, como observado na Figura 4.

Visando avaliar a viabilidade celular de ambas as espécies, os meios definidos também foram analisados quanto a alteração de pH, devido a presença de vermelho de fenol como indicador de pH em todos os meios (Tabela Suplementar S1). Em um meio recém inoculado, o pH encontra-se em torno de 8,2, e o meio apresenta coloração vermelha, o que interpretamos como ausência de crescimento bacteriano. Uma vez que a bactéria começa a se multiplicar, os metabólitos gerados pela sua duplicação, além do consumo dos nutrientes ali presentes, acidificam o meio, diminuindo o pH para aproximadamente 6,6. Essa alteração de pH faz com o meio passe da cor vermelha para amarelo, o que denota crescimento bacteriano (Friis, 1975), como visto na Figura Suplementar S1a. Deste modo, é esperado que os cultivos apresentem coloração amarela após 48 h de incubação. Entretanto, após 48 horas de cultivo, essa alteração foi visualizada apenas nos cultivos dos meios CMRL e CMRL+. Os cultivos de micoplasma nos meios YUS e YUSm alteraram sua cor somente para laranja (cor intermediária entre vermelho e amarelo), indicando que houve uma alteração de pH diferente da esperada. Este fato pode indicar que houve um crescimento nesses cultivos, porém atingiram uma concentração inferior, em comparação aos cultivos nos outros dois meios (Figura S1b). Também pode se sugerir que a capacidade de metabolizar os nutrientes fornecidos por estes dois meios pode ser reduzida, quando comparada aos outros meios. Deste modo, não se observa influência do metabolismo no pH, se supormos que a bactéria não metaboliza todos os componentes presentes no meio.

Em uma segunda análise da viabilidade, os cultivos de 48 h de YUS, YUSm, CMRL e CMRL+ foram utilizados como pré-inóculo para uma nova cultura em meio Friis. A análise visual das culturas em meio Friis mostrou que a alteração de cor para amarelo foi observada após 72 h de incubação nas culturas com pré-inóculos dos meios CMRL e CMRL+, e somente após 96 h de incubação nas culturas cujos pré-inóculos foram cultivados nos meios YUS e YUSm (Figura Suplementar S1b). Entretanto essa modificação tardia da coloração pode sugerir que não esteja ocorrendo crescimento bacteriano, e sim ser devido ao acúmulo de metabólitos que acidificaram o meio. Esse acúmulo de metabólitos foi apontado como um dos motivos do decréscimo na viabilidade das células quando o meio atinge a cor amarela, devido a acidificação (Friis, 1975). Este efeito pode ser prevenido com a adição de

álcali ao meio, no momento em que a alteração de cor é observada, postergando a queda da viabilidade dessas células, como reportado por Cook *et al.* (2016).

De acordo com Razin (1994), são necessárias, pelo menos, 100 a 1000 células para que uma cultura de micoplasma seja visualmente considerada positiva (Razin, 1994). Na teoria, bastaria uma única célula, mas na prática, devido a diversos fatores, como a formação de agregados celulares ou micro colônias e presença de células não-viáveis ou danificadas, é necessário um pré-inóculo maior. Portanto, as células de micoplasma podem ainda estar presentes nestes meios, mas em concentrações inferiores às necessárias para proporcionar um crescimento regular, detectável pela alteração de cor do meio. Ainda assim, é possível que a suplementação do meio CMRL (CMRL+) permita uma proliferação celular basal, mas, após 48 h, o esgotamento de alguns componentes pode acabar cessando o crescimento.

A suplementação do meio CMRL (CMRL+) inicialmente parece sustentar o crescimento de micoplasma. Porém, componentes necessários para o crescimento que inicialmente estavam presentes já não estão mais disponíveis ao final das 48 h de cultivo. Outra adversidade pode ser a maneira em que alguns fatores essenciais são fornecidos, sendo disponibilizados de forma não assimilada por micoplasmas. Entretanto, nossos resultados demonstraram a presença de micoplasmas viáveis em todos os meios testados até 48 h de cultivo.

Mecanismos de regulação gênica em *M. hyopneumoniae* ainda são parcialmente desconhecidos e, até agora, estão relacionados com alguns reguladores transcricionais, presença de possíveis sRNAs, promotores, terminadores e/ou sequências repetidas (Weber *et al.*, 2012; Siqueira, Weber, *et al.*, 2014; Fritsch *et al.*, 2015; Cattani *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2016). Visando melhor entender a regulação gênica de *M. hyopneumoniae*, esta foi analisada quando a bactéria foi cultivada em meio CMRL+, por ser o meio com taxa de crescimento que mais se assemelhou ao meio Friis. Assim, 18 genes foram selecionados (Tabela Suplementar S2) para terem sua expressão analisada nos dois diferentes meios (Friis e CMRL+), assim como nas três condições de cultivo (padrão, choque térmico e estresse oxidativo), por RT-qPCR.

Os genes analisados estão compreendidos em seis classes funcionais diferentes: (i) transcrição; (ii) replicação, recombinação e reparo; (iii) transporte e metabolismo de

carboidratos; (iv) produção e conversão de energia; (v) tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular, e (vi) metabolismo e transporte de íons inorgânicos.

Inicialmente, o perfil transcricional de *M. hyopneumoniae* foi analisado ao comparar as três condições de cultivo (padrão, choque térmico e estresse oxidativo) em cada meio separadamente (Friis e CMRL+). Algumas diferenças em relação à regulação gênica foram observadas e estão apresentadas na Tabela 1. A grande maioria dos genes analisados apresentou alteração transcricional em pelo menos uma das condições de estresse testadas no meio CMRL+. Este resultado pode sugerir que os genes alteram seus níveis transcricionais mais rapidamente quando *M. hyopneumoniae* é cultivado em meio CMRL+, provavelmente devido ao estresse duplo causado pela combinação de quantidade específica de nutrientes em CMRL+ com o estresse oxidativo ou choque térmico. Essa combinação pode causar um impacto maior em *M. hyopneumoniae*, que responde alterando sua expressão gênica.

O tipo de regulação sofrida pelos genes analisados quando submetidos a choque térmico foi diferente entre os dois meios. Entretanto, quando *M. hyopneumoniae* foi submetido a estresse oxidativo, os genes apresentaram o mesmo padrão de regulação em ambos os meios. Alguns genes apresentaram um comportamento completamente diferente frente às condições de estresse. Enquanto que o cultivo em meio Friis causou, em geral, um impacto negativo sobre a expressão dos genes testados, o cultivo em meio CMRL+ demonstrou uma influência diferente: 16 genes estavam negativamente regulados e 12 genes estavam positivamente regulados, frente às duas condições de estresse (Tabela 1).

Em uma segunda análise, a expressão dos genes de *M. hyopneumoniae* foi comparada quando esta bactéria foi cultivada em meio Friis contra a expressão gênica quando cultivada em meio CMRL+, através das três condições de cultivo (padrão e estresse: térmico ou oxidativo). Para isso, o nível de expressão dos genes de *M. hyopneumoniae* quando cultivado em meio Friis foi considerado basal. Os diferentes meios e condições de cultivo resultaram em três comparações que revelaram alterações no nível de expressão dos genes analisados, que estão contidas na Tabela 1 e ilustradas na Figura 6.

Levando em consideração a falta de algumas rotas biossintéticas devido a sua capacidade codificadora limitada (Vasconcelos *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2014; Ferrarini

et al., 2016), *M. hyopneumoniae* deve obter do hospedeiro nutrientes e componentes essenciais para sua sobrevivência. Em condições *in vitro*, o meio de cultivo deve suprir essa demanda. Desta maneira, o cultivo de *M. hyopneumoniae* em meio CMRL+ também representa uma condição de estresse nutricional, uma vez que nem a suplementação do meio CMRL (CMRL+) o torna um meio tão rico quanto o meio Friis. Como visto na Figura 6, nove (50 %) genes testados encontram-se positivamente regulados não só na condição padrão, como também na condição de choque térmico. Isso pode sugerir que *M. hyopneumoniae*, além de responder a estresse oxidativo e térmico, também é capaz de responder a um estresse nutricional a nível transcricional. Desta maneira, a privação de algum nutriente ou até mesmo o acúmulo de metabólitos podem desencadear, através de um mecanismo até então desconhecido, uma mudança no perfil transcricional de alguns genes.

Neste sentido, Madsen *et al.* (2006b) analisaram a influência da privação de ferro, metal essencial para a maioria dos organismos, na transcrição de *M. hyopneumoniae* (Madsen *et al.*, 2006). O ferro serve como um cofator para enzimas envolvidas em processos celulares básicos (Halloran, 1993). A análise estatística revelou que 27 genes, que representam 4 % do total do genoma, apresentaram diferença transcricional significativa. Nove genes tiveram sua transcrição aumentada quando cultivados na ausência de ferro, enquanto que 18 genes estavam negativamente regulados (Madsen *et al.*, 2006). Ao comparar os resultados da transcrição quando cultivados em privação de ferro com resultados prévios de choque térmico (Madsen *et al.*, 2006), alguns genes encontram-se diferencialmente regulados em ambas as condições. Assim, pode-se propor que esses genes sejam considerados responsáveis pela resposta a estresse ambiental.

A análise detalhada dos resultados da Figura 6 e Tabela 1 revelou algumas características interessantes sobre alguns dos genes estudados. Por exemplo, o gene MHP7448_0637, que codifica para um antiterminador da transcrição nusG, é o único gene com transcrição diferenciada em todas as condições de cultivo testadas, quando se compara a expressão relativa de uma mesma condição de cultivo (padrão, choque térmico ou estresse oxidativo) entre os dois meios (Friis e CMRL+). A regulação negativa desse gene no meio CMRL+ quando submetido a estresse oxidativo pode indicar que a célula pode direcionar toda a sua energia para garantir sua viabilidade, não direcionando somente para a divisão celular. Já a proteína hipotética codificada pelo gene MHP7448_0476 é diferencialmente

expressa apenas nas condições de estresse, assim, embora ainda não possua uma função atribuída, esta pode estar envolvida na resposta a estresses ambientais. Os genes MHP7448_0116, MHP7448_0428 e MHP7448_0438, cuja transcrição está positivamente regulada no meio CMRL+ tanto na condição padrão quanto na condição de choque térmico, reforçam o fato de que a célula, quando em estresse, visa se manter viável por mais tempo. Isto porque o primeiro tem função relacionada à produção e conversão de energia e os dois últimos estão relacionados ao metabolismo e transporte de carboidrato. O estudo de Plesofsky *et al.* (2016) corrobora esses dados, pois os autores afirmam que o metabolismo de carboidratos em fungos é alterado a nível transcricional em resposta a dois tipos de estresse: (i) simples, pela indução de choque térmico, e (ii) duplo, privação nutricional de carboidrato além da condição de choque térmico (Plesofsky *et al.*, 2016). O aumento no nível transcricional no meio CMRL+ quando submetido a choque térmico de genes envolvidos na transcrição e replicação, recombinação e reparo (MHP7448_0398, MHP7448_0637, MHP7448_0593, MHP7448_0403, MHP7448_0581 e MHP7448_0249) possivelmente representa uma resposta às altas demandas de uma bactéria estressada pelo aumento repentino da temperatura.

Apesar da comprovada relevância de *M. hyopneumoniae* na produção de suínos, existem poucos estudos relatando mecanismos moleculares envolvidos na sua patogenicidade em resposta a mudanças ambientais. Sabe-se que micoplasma possui somente um fator sigma, portanto não possui o fator sigma alternativo envolvido na resposta a alterações de temperatura (Himmelreich *et al.*, 1996; Chambaud *et al.*, 2001; Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). Geralmente, a resposta a alterações de temperatura é caracterizada por uma síntese aumentada, porém de maneira transiente, de algumas proteínas. Esse estresse também causa um aumento da dependência da glicólise para geração de energia (Plesofsky *et al.*, 2016). Assim como em outros organismos, o choque térmico também aumenta a síntese de algumas proteínas específicas e diminui a produção de outras em micoplasmas (Dascher *et al.*, 1990). Uma análise do perfil transcricional de *M. hyopneumoniae* quando submetido a choque térmico revelou que 91 genes, que representam 14 % do número total de genes do genoma, sofrem alteração a nível transcricional como reação ao aumento de temperatura (Madsen *et al.*, 2006). Estes dados, juntamente com os obtidos no presente trabalho, sugerem que *M. hyopneumoniae* responde

a variações de temperatura alterando suas atividades transcricionais através de mecanismos ainda desconhecidos. Corroborando esses dados, Weiner *et al.* (2003) avaliaram os efeitos causados pelo mesmo estresse sobre o perfil transcricional de *M. pneumoniae*. Setenta e sete genes, que representam 11 % do genoma, estavam diferencialmente expressos: 47 (7 %) genes se encontravam positivamente regulados e 30 (4 %) genes, negativamente regulados (Weiner *et al.*, 2003). Isso indica que *M. pneumoniae*, similarmente a outros organismos, apresenta regulação gênica frente a mudanças ambientais.

Considerando a condição de estresse oxidativo utilizada neste trabalho, apenas dois genes revelaram um padrão de expressão gênica diferente e ambos estavam negativamente regulados no meio CMRL+. A toxicidade de peróxido de hidrogênio em bactérias é atribuída, principalmente, à causa de danos ao DNA. Peróxido de hidrogênio, ao reagir com o ferro celular livre, forma radicais hidroxil que interagem com o DNA, causando modificações e até quebra na dupla fita (Gusarov e Nudler, 2005). Os mecanismos utilizados por *M. hyopneumoniae* para contornar esses radicais tóxicos não são inteiramente conhecidos, e apenas poucos estudos foram realizados com esse objetivo. Entretanto, *M. hyopneumoniae* responde ao estresse oxidativo alterando seu perfil transcricional. Uma análise transcricional global de *M. hyopneumoniae* após a exposição a peróxido de hidrogênio revelou que 38 genes, que representam 6 % do total de genes do genoma, apresentam expressão diferencial, sendo que 13 genes apresentaram maior número de transcritos e 25 estavam negativamente regulados (Schafer *et al.*, 2007). Mesmo assim, a condição de estresse oxidativo parece ser menos danosa quando comparada com choque térmico (ou até estresse nutricional), uma vez que apenas dois dos 18 genes analisados no presente trabalho apresentaram expressão diferencial nessa condição.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que todos os meios definidos testados foram capazes de manter a concentração celular e viabilidade e, dentre eles, o meio CMRL+, desenvolvido neste estudo, demonstrou ser o mais adequado. CMRL+ forneceu a maior taxa de crescimento bacteriana dentre os meios definidos, se equiparando com a taxa de crescimento encontrada em meio Friis, além de evidenciar a presença de regulação gênica em resposta à sua composição e às condições de cultivos testadas. Assim, pode ser utilizado como uma ferramenta controladamente manipulável permitindo a definição das necessidades nutricionais de micoplasmas, assim como análises genéticas, como regulação gênica.

7. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de um meio de composição definida, que sustente o crescimento de *Mycoplasma*, apresenta-se como uma nova ferramenta que permite um avanço no conhecimento sobre *Mycoplasma*, através da realização de novos experimentos, como: manipulação genética, ensaios de metabolismo, aplicação e avaliação de resposta a condições de estresse, avaliação de regulação gênica, entre outros. Deste modo, o meio desenvolvido no presente trabalho pode ser utilizado como uma ferramenta controladamente manipulável na pesquisa de *Mycoplasma*.

8. REFERÊNCIAS

ASSUNCAO, P. et al. Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* growth by flow cytometry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1047-1054, 2005. ISSN 1364-5072.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: Sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 21-32, Jan-Mar 1997. ISSN 1080-6040.

BERTIN, C. et al. Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp *mycoides*. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 9, Jul 2013. ISSN 1932-6203.

BUYSSCHAERT, B. et al. Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 21, p. 9037-9051, Nov 2016. ISSN 0175-7598.

CALUS, D. et al. Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 3, p. 335-340, Dec 2010. ISSN 0167-7012.

CATTANI, A. M. et al. Repetitive Elements in *Mycoplasma hyopneumoniae* Transcriptional Regulation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168626, 2016.

CHAMBAUD, I. et al. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 29, n. 10, p. 2145-2153, 2001. ISSN 0305-1048 1362-4962.

CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 196-203, Apr 2013. ISSN 0966-842X.

COOK, B. S. et al. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 158-164, Nov 2016. ISSN 0378-1135.

COOPER, A. C. et al. Invitro Activity of Danofloxacin, Tylosin and Oxytetracycline against Mycoplasmas of Veterinary Importance. **Research in Veterinary Science**, v. 54, n. 3, p. 329-334, May 1993. ISSN 0034-5288.

DASCHER, C. C.; PODDAR, S. K.; MANILOFF, J. Heat-Shock Response in Mycoplasmas, Genome-Limited Organisms. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 4, p. 1823-1827, Apr 1990. ISSN 0021-9193.

DEPINCE-BERGER, A. E. et al. New tools in cytometry. **Morphologie**, v. 100, n. 331, p. 199-209, 12// 2016. ISSN 1286-0115.

EDWARD, D. G. F. A Selective Medium for Pleuropneumonia-Like Organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 238-243, 1947. ISSN 0022-1287.

EDWARD, D. G. F.; FITZGERALD, W. A. Cholesterol in the Growth of Organisms of the Pleuropneumonia Group. **Journal of General Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 576-586, 1951. ISSN 0022-1287.

FERRARINI, M. G. et al. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. **Bmc Genomics**, v. 17, p. 20, May 2016. ISSN 1471-2164.

FRIIS, N. F. Selective Medium for *Mycoplasma Suiipneumoniae*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 12, n. 3, p. 454-256, 1971. ISSN 0044-605X.

FRIIS, N. F. Isolation and Characterization of a New Porcine *Mycoplasma*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 13, n. 2, p. 284-&, 1972. ISSN 0044-605X.

FRIIS, N. F. Some Recommendations Concerning Primary Isolation of *Mycoplasma Suiipneumoniae* and *Mycoplasma Flocculare* - Survey. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 27, n. 6, p. 337-339, 1975. ISSN 0029-1579.

FRITSCH, T. E.; SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, I. S. Intrinsic terminators in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription. **Bmc Genomics**, v. 16, p. 12, Apr 2015. ISSN 1471-2164.

GARDELLA, R. S.; DELGIUDICE, R. A. Growth of Mycoplasma-Hyorhinis Cultivar-Alpha on Semisynthetic Medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1976-1979, May 1995. ISSN 0099-2240.

GARDNER, S. W.; MINION, F. C. Detection and quantification of intergenic transcription in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Microbiology-Sgm**, v. 156, p. 2305-2315, Aug 2010. ISSN 1350-0872.

GODINHO, K. S. Susceptibility testing of tulathromycin: Interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 426-432, Jun 2008. ISSN 0378-1135.

GUANTES, R. et al. Positive regulatory dynamics by a small noncoding RNA: speeding up responses under temperature stress. **Molecular Biosystems**, v. 8, n. 6, p. 1707-1715, 2012. ISSN 1742-206X.

GUSAROV, I.; NUDLER, E. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13855-13860, Sep 2005. ISSN 0027-8424.

HALLORAN, T. V. Transition metals in control of gene expression. **Science**, v. 261, n. 5122, p. 715, 1993.

HANNAN, P. C. T.; OHANLON, P. J.; ROGERS, N. H. *In Vitro* Evaluation of Various Quinolone Antibacterial Agents against Veterinary Mycoplasmas and Porcine Respiratory Bacterial Pathogens. **Research in Veterinary Science**, v. 46, n. 2, p. 202-211, Mar 1989. ISSN 0034-5288.

HAYFLICK, L. Tissue Cultures and Mycoplasmas. **Texas Reports on Biology and Medicine**, v. S 23, p. 285-&, 1965. ISSN 0040-4675.

HIMMELREICH, R. et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 22, p. 4420-4449, 1996. ISSN 0305-1048 1362-4962.

JAFFE, J. D. et al. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. **Genome Research**, v. 14, n. 8, p. 1447-1461, Aug 2004. ISSN 1088-9051.

KINGSFORD, C. L.; AYANBULE, K.; SALZBERG, S. L. Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 2, p. R22-R22, 02/21, Jan, 2007. ISSN 1465-6906 1465-6914.

KOBISCH, M.; FRIIS, N. F. Swine mycoplasmoses. **Rev. sci. tech.**, v. 15, n. 4, p. 6, 1996.

KUMARI, M.; GUPTA, R. P. In vitro antibacterial effect of *Withania somnifera* root extract on *Escherichia coli*. **Veterinary World**, India, v. 8, n. 1, p. 57-60, 01/17, Mai 2015. ISSN 0972-8988 2231-0916.

LLUCH-SENAR, M. et al. Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium. **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 1, p. 7, Jan 2015. ISSN 1744-4292.

MADSEN, M. L. et al. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 160-166, Jan 2006. ISSN 0019-9567.

MADSEN, M. L. et al. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. **Microbiology-Sgm**, v. 152, p. 937-944, Apr 2006. ISSN 1350-0872.

MADSEN, M. L. et al.. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 658-663, Feb 2008. ISSN 0019-9567.

MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 297-309, Jan 2008. ISSN 0378-1135.

MARE, C. J.; SWITZER, W. P. New Species: *Mycoplasma Hyopneumoniae*; a Causative agent of Virus Pig Pneumonia. **Vet Med Small Anim Clin**, v. 60, p. 5, 1965.

MINION, F. C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7123-7133, Nov 2004. ISSN 0021-9193.

MITRA, A. et al. Occurrence, divergence and evolution of intrinsic terminators across Eubacteria. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 110-116, Aug 2009. ISSN 0888-7543.

MUTO, A.; USHIDA, C. Transcription and Translation. In: RAZIN, S. e HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. Boston, MA: Springer US, 2002. p.323-345. ISBN 978-0-306-47606-8.

NANNINGA, N.; KOPPEL, L. J. H.; DEVRIESTIJSEN, F. C. Cell-Cycle of *Bacillus Subtilis* as Studied by Electron-Microscopy. **Archives of Microbiology**, v. 123, n. 2, p. 173-181, 1979. ISSN 0302-8933.

ONEAL, M. J. et al. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. **Microbiology-Sgm**, v. 154, p. 2581-2588, Sep 2008. ISSN 1350-0872.

OSELLA, M.; NUGENT, E.; LAGOMARSINO, M. C. Concerted control of *Escherichia coli* cell division. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3431-3435, Mar 2014. ISSN 0027-8424.

PIFFER, I. A.; ROSS, R. F. Effect of Age on Susceptibility of Pigs to *Mycoplasma Hyopneumoniae* Pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 3, p. 478-481, 1984. ISSN 0002-9645.

PLESOFSKY, N. et al. Glucose Starvation Alters Heat Shock Response, Leading to Death of Wild Type Cells and Survival of MAP Kinase Signaling Mutant. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 31, Nov 2016. ISSN 1932-6203.

POLLACK, J. D.; WILLIAMS, M. V.; MCELHANEY, R. N. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 269-354, 1997. ISSN 1040-841X.

RAZIN, S. Structure and Function in *Mycoplasma*. **Annual Review of Microbiology**, v. 23, p. 317-&, 1969. ISSN 0066-4227.

RAZIN, S. DNA Probes And PCR in Diagnosis of Mycoplasma-Infections. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 6, p. 497-511, Dec 1994. ISSN 0890-8508.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, Mar 2010. ISSN 1045-1056.

RAZIN, S.; KNIGHT, B. A Partially Defined Medium for the Growth of *Mycoplasma*. **Journal of General Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 492-503, 1960a. ISSN 0022-1287.

RAZIN, S.; KNIGHT, B.. The Effects of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid on The Growth of *Mycoplasma*. **Journal of General Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 504-519, 1960b. ISSN 0022-1287.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Cholesterol Requirement of Mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, v. 102, n. 2, p. 306-310, 1970. ISSN 0021-9193.

RAZIN, S.; TULLY, J. G.. **Methods in Mycoplasmaology**. New York: Academic Press, INC. I - Mycoplasma characterization 1983.

RAZIN, S. **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology**. San Diego, California: Academic Press, INC, 1995.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, Dec 1998. ISSN 1092-2172.

RODWELL, A. W.; ABBOT, A. Function of Glycerol, Cholesterol and Long-Chain Fatty Acids in Nutrition of *Mycoplasma Mycoides*. **Journal of General Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 201-214, 1961. ISSN 0022-1287.

ROSS, R. F.; YOUNG, T. F. The Nature and Detection of Mycoplasmal Immunogens. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 3-4, p. 369-380, Nov 1993. ISSN 0378-1135.

SAKIL MUNNA, M. et al. Survival of *Bacillus* spp. SUBB01 at high temperatures and a preliminary assessment of its ability to protect heat-stressed *Escherichia coli* cells. **BMC Research Notes**, London, v. 8, p. 637, Mar 2015. ISSN 1756-0500.

SCHAFER, E. R. et al. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. **Microbiology-Sgm**, v. 153, p. 3785-3790, Nov 2007. ISSN 1350-0872.

SCHULTZE, T. et al. Current status of antisense RNA-mediated gene regulation in *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 6, Sep 2014. ISSN 2235-2988.

SIQUEIRA, F. M. et al. *Mycoplasma* non-coding RNA: identification of small RNAs and targets. **BMC Genomics**, v. 17, n. 8, p. 743, 2016// 2016. ISSN 1471-2164.

SIQUEIRA, F. M. et al. Unravelling the Transcriptome Profile of the Swine Respiratory Tract Mycoplasmas. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 12, Oct 2014. ISSN 1932-6203.

SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S. *Mycoplasma hyopneumoniae* Transcription Unit Organization: Genome Survey and Prediction. **DNA Research**, v. 18, n. 6, p. 413-422, Dec 2011. ISSN 1340-2838.

SIQUEIRA, F. M. et al. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **Bmc Genomics**, v. 14, p. 17, Mar 2013. ISSN 1471-2164.

SIQUEIRA, F. M. et al. Genome organization in *Mycoplasma hyopneumoniae*: identification of promoter-like sequences. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 8, p. 5395-5402, Aug 2014. ISSN 0301-4851.

SIRAND-PUGNET, P. et al. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 10, p. 754-766, Dec 2007. ISSN 0923-2508.

SMITH, P. F. Synthetic Media for Pleuropneumoniae-like Organisms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 88, n. 4, p. 628-631, 1955. ISSN 0037-9727.

SMITH, P. F.; LECCE, J. G.; LYNN, R. J. A Lipoprotein as a Growth Factor for Certain Pleuropneumoniae-like Organisms. **Journal of Bacteriology**, v. 68, n. 5, p. 627-633, 1954. ISSN 0021-9193.

SORDELLI, D. O.; CERQUETTI, M. C.; HOOKE, A. M. Replication Rate of *Pseudomonas Aeruginosa* in the Murine Lung. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 2, p. 388-391, 1985. ISSN 0019-9567.

STEMKE, G. W.; ROBERTSON, J. A. The Growth-Response of *Mycoplasma Hyopneumoniae* and *Mycoplasma-Flocculare* Based upon ATP-Dependent Luminometry. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 135-142, Aug 1990. ISSN 0378-1135.

TANNER, A. C.; ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F. Adaptation of the Sensititre (R) Broth Microdilution Technique to Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycoplasma Hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 36, n. 3-4, p. 301-306, Sep 1993. ISSN 0378-1135.

TERLAAK, E. A. et al. Comparison of Methods for *in vitro* Testing of Susceptibility of Porcine *Mycoplasma* Species to Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 2, p. 228-233, Feb 1991. ISSN 0066-4804.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v. 12, n. 5, p. 252-254, Sep-Oct 2004. ISSN 1537-209X.

THACKER, E. L. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 620-627, Mar 1999. ISSN 0095-1137.

THANAWONGNUWECH, R. et al. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 5, p. 901-908, Sep 2004. ISSN 1071-412X.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5568-5577, Aug 2005. ISSN 0021-9193.

WEBER, S. D.; SANT'ANNA, F. H.; SCHRANK, I. S. Unveiling *Mycoplasma hyopneumoniae* Promoters: Sequence Definition and Genomic Distribution. **DNA Research**, v. 19, n. 2, p. 103-115, Apr 2012. ISSN 1340-2838.

WEINER, J. et al. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 21, p. 6306-6320, Nov 2003. ISSN 0305-1048.

WILLIAMS, P. P. *In vitro* Susceptibility of *Mycoplasma Hyopneumoniae* and *Mycoplasma Hyorhinitis* to 51 Anti-Microbial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, n. 2, p. 210-213, 1978. ISSN 0066-4804.

YUS, E. et al. Impact of Genome Reduction on Bacterial Metabolism and Its Regulation. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1263-1268, Nov 2009. ISSN 0036-8075.

ZIMMERMAN, J. J. et al. **Diseases of Swine**. 10th. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

9. CURRICULUM VITAE

BEIER, L.S.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Laura Scherer Beier

Nascimento: 14/08/1992, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: laurabeier14@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Título: Viabilidade de Mycoplasmas em Diferentes Condições de Cultivo

Orientadora: Dra. Irene Silveira Schranck

Período: 2015 – 2017

Graduação em Farmácia

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil

Título: Desenvolvimento e Validação de Metodologia para a Determinação da Pureza Radioquímica do Radiofármaco [¹¹C]PK11195, pela Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Orientador: Dr. Airton Monza da Silveira

Período: 2010 – 2014

3. ESTÁGIOS

Estágio Obrigatório Final

Instituto de Cérebro do Rio Grande do Sul, InsCer, Porto Alegre, RS, Brasil

Estágio de Iniciação Científica

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Título: Estudo de Variantes Polimórficas Associadas a Risco Cardiovascular em Pacientes com Síndrome Metabólica.

Orientador: Virgínia Minghelli Schmitt.

Período: 2012 – 2013

Estágio de Iniciação Científica

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Título: Validação de Metodologia para Determinação de Cotinina em Líquido Amniótico.

Orientador: Flávia Valladão Thiesen.

Período: 2011 – 2012

Estágio de Iniciação Científica

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Título: Efeito da Simulação da Hipergravidade Sobre a Germinação, o Crescimento e o Metabolismo de Plantas de Interesse Farmacêutico.

Orientador: Marlise Araújo dos Santos.

Período: 2010 – 2011

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

SIQUEIRA, F. M., DE MORAES, G. L., HIGASHI, S., BEIER, L. S., BREYER, G. M., DE AS GODINHO, C. P., SAGOT, M. F., SCHRANCK, I. S., ZAHA, A., DE VASCONCELOS, A. T. Mycoplasma non-coding RNA: identification of small RNAs and targets. **BMC Genomics**, v. 17, n. 8, p. 743, 2016// 2016. ISSN 1471-2164.

5. RESUMOS PUBLICADOS EM EVENTOS E CONGRESSOS

MANICA, G.; BEIER, L. S.; RAMOS, V. C.; COLLIN, A.C.; CARDOSO, R. B.; RUSSOMANO, T.; SANTOS, M. A.; MONDIN, C.; LOPES, M. H. TELEFARMÁCIA: Viabilização da capacitação de profissionais de saúde na identificação de interações entre plantas medicinais e medicamentos. In: XI Salão de Iniciação Científica, PUCRS, 2010,

Porto Alegre. Anais do XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2010.

BEIER, L. S.; SANTOS, M. A. Efeito da Simulação da Hipergravidade Sobre a Germinação, o Crescimento e o Metabolismo de Plantas de Interesse Farmacêutico. In: XII Salão de Iniciação Científica, PUCRS, 2011, Porto Alegre. Anais do XII Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2011.

BEIER, L. S., THIESEN, F. V. Validação de Metodologia para Determinação de Cotinina em Líquido Amniótico. In: XIII Salão de Iniciação Científica, PUCRS, 2012, Porto Alegre. Anais do XIII Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2012.