

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

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

Lucas Moitinho e Silva

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

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, março de 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Funcional e Estrutural, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICO

Aos meus amados pais, pelo carinho,
compreensão e incentivo durante toda a
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela oportunidade oferecida, orientação, amizade, dedicação e valerosos ensinamentos.

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela disponibilidade, auxílio e presteza oferecidos durante todo o trabalho.

Ao Dr. Luiz Juliano Neto, pelo interesse, contribuição e colaboração em relação aos ensaios de clivagem e síntese de peptídeos.

Ao colega Cláudio X. Machado, pelas soluções compartilhadas em laboratório e cervejas apreciadas em bares.

Ao colega Paulo Marcos Pinto, pelas longas e importantes discussões filosóficas e científicas.

À colega Veridiana G. Virginio, pela amizade e ajuda constante.

Às alunas de iniciação científica Bianca L. Heineck e Jéssica Paes, pela contribuição e dedicação aos trabalhos.

Aos demais atuais e ex-colegas do laboratório 210 que tornaram leves os dias mais tensos através da amizade e companheirismo.

Aos colegas do laboratório 204-206, pelos almoços no RU, convívio e auxílio constantes.

Aos colegas que trabalham com *Mycoplasma*, pelas discussões e colaborações.

Aos funcionários do Cbiot, em especial “seu Milton” e Paulo da sala de esterilização; e Silvinha e Luciano da secretaria do PPGBCM.

A todos os “amigos de corredor” e demais colegas que não negam um bom papo furado e que me ensinaram e auxiliaram em muitos experimentos.

Aos melhores do Ska, principalmente The Slackers, por tornar menos silenciosas as noites passadas no laboratório.

A todos da minha família, pela compreensão, suporte e constante presença. Em especial agradeço a meus pais, meu irmão Mateus e minha prima Jane.

À Déa, pelo sorriso, carinho, alegria e risotos; que iluminaram meus dias e desembaraçaram minhas filogenias.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. Introdução	16
1.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e pneumonia enzoótica suína	16
1.2 Sistemas de exportação de proteínas presentes em <i>M. hyopneumoniae</i>	22
1.3 Sinal-peptidase I	27
2. Justificativa	29
3. Objetivo geral	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. Resultados	31
PARTE 1	32
Signal peptidase I of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>: a virulence factor and a potential diagnostic antigen	32
Abstract	34
1. Introduction	35
2. Materials and Methods	37
2.1 <i>Bacteria, culture conditions and protein and nucleic acids extractions</i>	37

2.2 Operon confirmation by RT-PCR	38
2.3 Cloning of sipS gene, expression and purification of rMhSPase I	40
2.4 Immunization of mice	40
2.5 Immunoblot assays	41
2.6 SPase I amino acid sequence and phylogenetic analyses	41
2.7 Serum samples	42
2.8 ELISA	42
3. Results	43
3.1 Transcription analysis of sipS operon	43
3.2 Expression of rMhSPase I and production of an anti-rMhSPase I serum	45
3.3 SPase I expression in different M. hyopneumoniae strains	47
3.4 Sequence comparisons, structure prediction, and phylogenetic analysis of MhSPase I	48
3.5 Standardization and preliminary evaluation of a rMhSPase I-based ELISA for detection of M. hyopneumoniae infections	52
4. Discussion	54
Acknowledgments	58
References	58
PARTE 2	63
Ensaio funcional da sinal-peptidase I recombinante de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	63
1. Materiais e métodos	64
1.1 Predição e síntese de PSs	64
1.2 Purificação da rMhSPase I para ensaios funcionais	65

1.3 Ensaio de clivagem <i>in vitro</i> de PSs sintéticos pela rMhSPase I	66
2. Resultados	68
2.1 PSs de <i>M. hyopneumoniae</i> cliváveis pela SPase I	68
2.2 Ensaio de clivagem <i>in vitro</i> de PSs sintéticos pela rMhSPase I	72
5. Discussão final	75
6. Conclusões e perspectivas	86
7. Referências bibliográficas (exceto Parte 1)	87
<i>CURRICULUM VITAE</i> RESUMIDO	97

LISTA DE ABREVIATURAS

CDRS: complexo de doenças respiratórias de suínos

CDS: sequência de DNA codificadora

DMSO: dimetilsulfóxido

DP: desvio padrão

ELISA: ensaio imunosorbente ligado à enzima

ELISA-SPase I: ELISA cujo antígeno é a sinal-peptidase I recombinante do *M.*

hyopneumoniae

ELISA-T: ELISA Tween 20

GST: glutationa-S-transferase

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho, do inglês *high performance liquid*

chromatography

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb: quilo bases

KEGG: Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto

MALDI/TOF: ionização/dessorção de matriz assistida por laser, tempo de voo; do inglês

Matrix-assisted laser desorption/ionization, Time of Flight

Mb: mega bases

MhSPase I: sinal-peptidase I do *M. hyopneumoniae*

P97R1: região repetitiva R1 da adesina P97

PCR: reação em cadeia da polimerase

PES: pneumonia enzoótica suína

PS: peptídeo-sinal

rMhSPase I: sinal-peptidase I recombinante do *M. hyopneumoniae*

sistema Sec: sistema geral de secreção

sistema Tat: sistema de translocação de argininas geminadas, do inglês *twin-arginine translocation pathway*

SPase I: sinal-peptidase I

SRP: partícula de reconhecimento de sinal

TCA: ácido tri-cloro acético

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica do corte do epitélio do bronquíolo de um porco inoculado com a linhagem MI-3 de <i>M. hyopneumoniae</i>	18
Figura 2. Componentes de mecanismos de exportação/integração de proteínas na membrana plasmática identificados em <i>M. hyopneumoniae</i> 7448.....	23
Figura 3. PS bacteriano característico	26
Figura 4. Peptídeos-sinal e sítios de clivagem por SPase I preditos pertencentes a proteínas preditas de serem secretadas pelo sistema Sec em <i>M. hyopneumoniae</i> 7448....	70
Figura 5. Frequência de aminoácidos nas posições -1 e -3 dos PSs de proteínas de confiabilidade 1 e 2	71
Figura 6. PSs sintéticos utilizados nos ensaios de clivagem <i>in vitro</i> pela rMhSPase I	72
Figura 7. Espectros de massas correspondentes aos PSs sintéticos após os ensaios de clivagem <i>in vitro</i> com ou sem a presença da rMhSPase I nas diversas condições testadas	74

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1. Structure and transcriptional analysis of the <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 <i>sipS</i> operon.....	45
Figure 2. Recombinant MhSPase I production by <i>E. coli</i> and expression of SPase I in <i>M. hyopneumoniae</i> strains	46
Figure 3. Multiple sequence alignment of <i>M. hyopneumoniae</i> SPase I and orthologous from <i>Mycoplasma</i> and PRDC-related bacteria	49
Figure 4. Phylogeny of <i>M. hyopneumoniae</i> SPase I and orthologous from <i>Mycoplasma</i> and PRDC-related bacteria	52
Figure 5. Standardization of ELISA-SPase I and immunoreactivity of ELISA-SPase I and ELISA-T for field samples	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Predição das massas moleculares dos PSs sintéticos antes e após a clivagem pela rMhSPase I	73
Tabela 2. Condições usadas em ensaios de clivagem com SPase I recombinante e PSs sintéticos em outros trabalhos	80

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

Table 1. Oligonucleotide primers used for cloning and transcriptional analysis	39
Table 2. Comparison between ELISA-SPase I and ELISA-T results for field samples.....	54

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é uma bactéria pertencente à classe *Mollicutes*, sendo o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína e o agente primário do complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS). A sinal-peptidase I (SPase I) é uma endopeptidase de membrana que cliva os peptídeos-sinal (PS) de proteínas transportadas pelo sistema geral de secreção. A SPase I do *M. hyopneumoniae* (MhSPase I) é codificada pela sequência de DNA codificadora (CDS) *sipS*, presente nas 3 linhagens da espécie com genomas já sequenciados. Este trabalho tem como objetivo caracterizar funcional e imunologicamente a MhSPase I, assim como investigar a sua relação com a virulência da bactéria. Foi demonstrado que *sipS* é parte de um operon, sendo cotranscrita com outras 4 CDSs. A CDS *sipS* foi clonada e a MhSPase I recombinante (rMhSPase I) foi expressa em *Escherichia coli*. A rMhSPase I mostrou-se altamente imunogênica para camundongos e seu caráter antigênico foi confirmado para suínos. A MhSPase I apresentou expressão diferencial em linhagens patogênicas e não patogênicas de *M. hyopneumoniae* corroborando a ideia de que essa enzima é um fator de virulência da bactéria. Análises de sequências de aminoácidos evidenciaram que a MhSPase I tem baixa identidade com enzimas ortólogas de outras espécies de micoplasmas e de bactérias relacionadas ao CDRS. O potencial sorodiagnóstico da rMhSPase I foi demonstrado em um ELISA. Predições *in silico* de possíveis PSs clivados pela MhSPase I indicaram que proteínas hipotéticas e proteínas de membrana, incluindo adesinas, seriam substratos da enzima. Ensaio de atividade *in vitro* com PSs sintéticos derivados de predições *in silico*, contudo, não foram conclusivos. Estudos futuros deverão elucidar o papel da SPase I na exportação de proteínas em *M. hyopneumoniae* e explorar o potencial da enzima como antígeno vacinal ou diagnóstico.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is a bacterium that belongs to the *Mollicutes* class, being the etiological agent of porcine enzootic pneumoniae and one of the primary agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC). Signal peptidase I (SPase I) is a membrane-bound endopeptidase that cleaves the signal peptide (SP) of proteins exported by the general secretory pathway. The *M. hyopneumoniae* SPase I (MhSPase I) is coded by the *sipS* gene in all of the three *M. hyopneumoniae* genomes sequenced. The aims of this work are to functional and immunologically characterize the MhSPase I and to investigate its relation with the virulence of the bacterium. The *sipS* coding DNA sequence (CDS) was demonstrated to be part of an operon, being co-transcribed along with 4 other CDSs. The *sipS* CDS was cloned and the recombinant MhSPase I (rMhSPase I) was expressed in *Escherichia coli*. The rMhSPase I was highly immunogenic for mice and the antigenicity for pigs was demonstrated. The observed differential expression of MhSPase I between pathogenic strains and one non pathogenic strain of *M. hyopneumoniae* corroborates the notion of MhSPase I as a virulence factor. Amino acid sequence analyses of MhSPase I and SPases I from other *Mycoplasma* and PRDC bacteria evidenced low conservation between these enzymes. The potential serodiagnosis application of rMhSPase I was demonstrated by an ELISA. *In silico* predictions of putative SPs cleaved by MhSPase I were performed, indicating that hypothetical and membrane proteins, including adhesins, have cleavable SPs. *In vitro* cleavage assays of rMhSPase I were developed with synthetic SPs, but the results were not conclusive. Further studies should elucidate the role of SPase I in the exportation of proteins in *M. hyopneumoniae* and the putative application of MhSPase I as an antigen for vaccination and diagnosis.

1. Introdução

1.1 *Mycoplasma hyopneumoniae* e pneumonia enzoótica suína

Mycoplasma hyopneumoniae é uma bactéria patogênica para suínos pertencente ao filo *Tenericutes*, classe *Mollicutes*. A classe *Mollicutes* (do latim *mollis*: macio; *cutis*: pele) inclui as bactérias que não possuem parede celular, as quais apresentam genomas reduzidos, variando de 580 kb a 1,4 Mb (Barre *et al.*, 2004). Acredita-se que as bactérias da classe *Mollicutes* (molicutes) tenham evoluído de ancestrais comuns às bactérias gram-positivas de baixo conteúdo de G+C (Fadiel *et al.*, 2007) através de uma série de perdas gênicas. As consequências da redução do genoma são a simplificação e até a perda de rotas metabólicas (como a rota de biossíntese de aminoácidos ou de parede celular, por exemplo) (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007). No entanto, tais perdas não implicam em perda das capacidades de adaptação e de resposta metabólica, que se mantêm similares às de espécies mais complexas (Yus *et al.*, 2009).

Os molicutes são geralmente parasitas, tendo uma grande variedade de hospedeiros, como seres humanos, mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas (Razin, 1992). O genoma reduzido e o interesse econômico decorrente das doenças causadas por espécies do gênero *Mycoplasma* (micoplasmas) fizeram com que estas bactérias estivessem entre os primeiros organismos cujos genomas foram completamente sequenciados (Fraser *et al.*, 1995). Atualmente, existem 14 espécies do gênero *Mycoplasma* cujos genomas completos estão disponíveis em bancos de dados públicos (Benson *et al.*, 2008). Os genomas de três linhagens de *M. hyopneumoniae* foram completamente sequenciados até agora: os de duas linhagens patogênicas (232 e 7448) e o de uma linhagem não patogênica (J) (Minion *et al.*,

2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). A análise comparativa dos três genomas de *M. hyopneumoniae* abriu novas perspectivas para o entendimento desta espécie, desencadeando uma série de estudos elucidativos relativos ao seu metabolismo e virulência (Madsen *et al.*, 2006; Ferreira & Castro, 2007; Pinto *et al.*, 2007a; Madsen *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009).

M. hyopneumoniae adere ao epitélio ciliado do sistema respiratório suíno (Figura 1) causando a pneumonia enzoótica suína (PES). Em suínos, o *M. hyopneumoniae* é encontrado na superfície mucosa da traquéia, brônquios e bronquíolos (Kobisch *et al.*, 1978; Blanchard *et al.*, 1992), mais especificamente na parte superior dos cílios epiteliais, no espaço interciliar e em contato com as microvilosidades (Jacques *et al.*, 1992). A adesão do *M. hyopneumoniae* aos cílios é mediada por moléculas presentes na sua membrana plasmática, principalmente carboidratos e proteínas (Zielinski & Ross, 1993). As adesinas são as principais proteínas responsáveis pela aderência, como evidenciado por estudos sobre as adesinas P97, P216 e P159 (Hsu *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 2006; Wilton *et al.*, 2009). Estas adesinas passam por um processo proteolítico pós-traducional, que resulta em um padrão complexo de seus fragmentos presentes na superfície da membrana celular. Apesar da capacidade de aderência em ensaios *in vitro* não corresponder à virulência *in vivo* do *M. hyopneumoniae* (Calus *et al.*, 2009), as adesinas estão entre os fatores de virulência mais estudados.

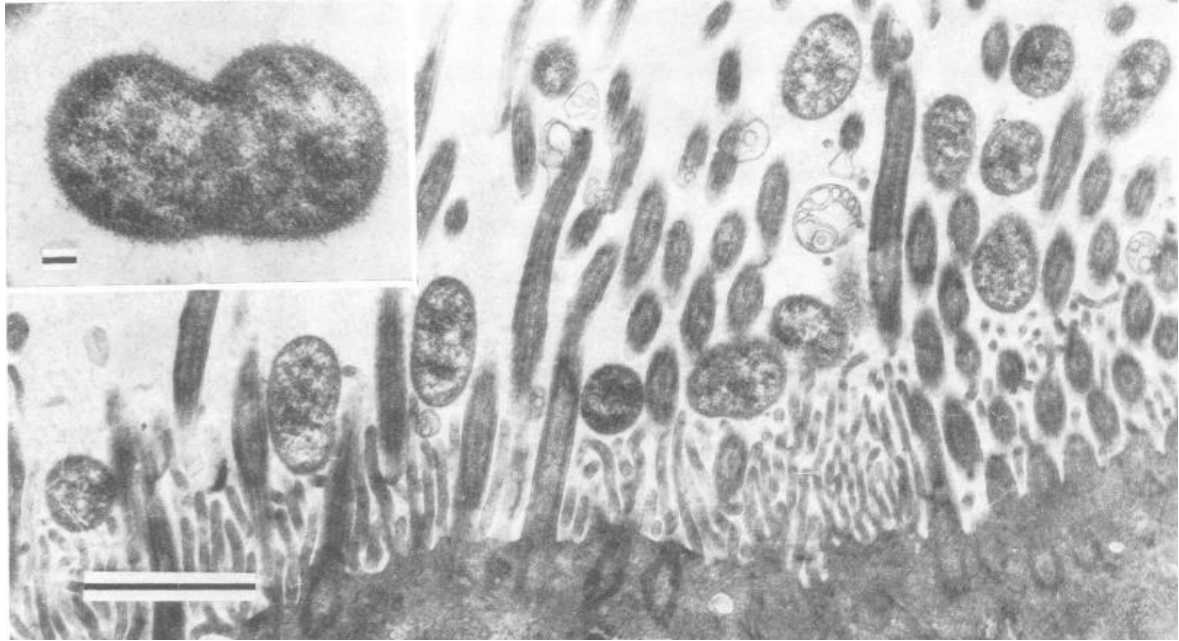


Figura 1. Microscopia eletrônica do corte do epitélio do bronquíolo de um porco inoculado com a linhagem MI-3 de *M. hyopneumoniae*. Podem-se observar inúmeros micoplasmas entre os cílios. As barras de escala representam 1 nm. Em destaque, *M. hyopneumoniae* em provável processo de divisão celular (Tajima & Yagihashi, 1982).

A adesão de células de *M. hyopneumoniae* aos cílios, leva à redução da atividade ciliar, que evolui para a degeneração e desaparecimento dos cílios, esfoliação das células epiteliais e aparecimento de exsudato nas vias aéreas (Jacques *et al.*, 1992). A presença de *M. hyopneumoniae* nas vias aéreas desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada por infiltração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Blanchard *et al.*, 1992) e pela produção de citocinas pró-inflamatórias (Asai *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 2004; Muneta *et al.*, 2008). Os principais isotipos de anticorpos identificados em pulmões infectados são IgA e IgG (Messier *et al.*, 1990; Maes *et al.*, 1996). Apesar dos avanços no estudo da resposta imunológica do suíno contra *M. hyopneumoniae*, os fatores envolvidos na imunidade protetora ou na resposta inflamatória contra o *M. hyopneumoniae* ainda são pouco conhecidos.

A PES leva a uma diminuição na conversão alimentar do animal, sendo os principais sintomas tosse seca, febre leve e discreta anorexia. Os sinais clínicos, como a tosse, podem desaparecer em até dois meses após a infecção (Sorensen *et al.*, 1997), mas a infecção por *M. hyopneumoniae* pode durar até 200 dias (Pieters *et al.*, 2009). Quando em más condições de alojamento e manejo dos animais, a infecção por *M. hyopneumoniae* pode ser agravada por infecções de patógenos secundários ou bactérias oportunistas, o que constitui o complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS). Além do *M. hyopneumoniae*, os agentes primários do CDRS são agentes virais, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), o vírus da influenza suína (SIV), o vírus da pseudorraiva (PRV), o coronavírus respiratório suíno (PRCV) e o circovírus suíno tipo 2 (PCV2); e as bactérias patogênicas *Bordetella bronchiseptica* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Além disso, o CDRS é caracterizado por infecções de bactérias oportunistas, como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis* e *Arcanobacterium pyogenes* (Brockmeier *et al.*, 2002).

A criação de suínos no Brasil é uma importante atividade para a economia nacional. Segundo o último relatório anual da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, a produção de carne suína nacional foi de 3.029 mil toneladas (Abipecs, 2008). Aproximadamente 88,6% da produção de carne suína é exportada, gerando uma receita de 1.492 milhões de dólares. Através da análise das lesões pulmonares de suínos, foi verificada a ocorrência de PES em 75,4% das carcaças em abatedouros das regiões sul, centro-oeste e sudeste, que correspondem a 96% da produção nacional (Silva *et al.*, 2001). Essa alta ocorrência da PES nas granjas do país acarreta grandes perdas econômicas à suinocultura brasileira, não só devido aos aspectos clínicos da doença, mas aos custos relativos à vacinação, terapia com antibiótico e manejo.

O controle da infecção por *M. hyopneumoniae* em granjas pode ser alcançado através da otimização das práticas de manejo e acondicionamento, estratégias de medicação profilática e vacinação (Maes *et al.*, 2008). No entanto, essas técnicas não garantem a erradicação do patógeno (Le Grand & Kobisch, 1996; Maes *et al.*, 2008). A eliminação do *M. hyopneumoniae* é comprometida devido à re-infecção de granjas livres de *M. hyopneumoniae* com uma frequência de 2,6% ao ano (Hege *et al.*, 2002). As principais fontes de re-introdução de *M. hyopneumoniae* em granjas livres do patógeno são por via aérea ou através da introdução de porcos infectados, mas diagnosticados sorologicamente como negativos (Maes *et al.*, 2008).

As vacinas disponíveis comercialmente contra *M. hyopneumoniae* são preparações de extratos celulares totais adicionadas de adjuvantes, conhecidas como bacterinas (Meyns *et al.*, 2006). Essas vacinas têm um custo de produção elevado, pois dependem do cultivo de *M. hyopneumoniae*, que é um organismo fastidioso (Friis, 1975). Mesmo não prevenindo os sintomas clínicos da PES ou a colonização do *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1998), o uso de vacinas pode ser vantajoso ao produtor, pois diminui a severidade das lesões e sintomas da PES (Meyns *et al.*, 2006) e melhora o ganho de peso diário (Jensen *et al.*, 2002) a um custo viável.

O método mais sensível para diagnóstico da infecção por *M. hyopneumoniae* é a cultura do micoplasma em meio Friis isolado de tecido pulmonar (Friis, 1975; Sorensen *et al.*, 1997), sendo este considerado o padrão ouro. No entanto, a cultura de *M. hyopneumoniae* é um método trabalhoso e demorado (o isolamento de *M. hyopneumoniae* pode levar de 4 a 8 semanas), com possibilidade de contaminação dos cultivos com *Mycoplasma hyorhinis* ou *Mycoplasma flocculare* (Maes *et al.*, 1996). Alternativas ao diagnóstico de *M. hyopneumoniae* por cultivo são a identificação sorológica ou métodos

moleculares (Sibila *et al.*, 2009). Apesar de métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), mostrarem-se confiáveis na detecção do patógeno (Sibila *et al.*, 2004), o sorodiagnóstico, principalmente o ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA), é a ferramenta mais utilizada para o monitoramento de *M. hyopneumoniae* em granjas (Sibila *et al.*, 2009).

São três os ELISAs mais utilizados mundialmente para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*: um ELISA de bloqueio monoclonal (Feld *et al.*, 1992) e dois ELISAs indiretos, ELISA Tween 20 (ELISA-T) (Nicolet *et al.*, 1980) e HerdChek® (IDEXX, USA). Em um estudo recente comparando estes três testes para detecção da infecção de *M. hyopneumoniae* em animais inoculados experimentalmente, Erlandson *et al.* (2005) verificaram alta especificidade em todos, mas sensibilidades variando entre 35 e 63%. As baixas sensibilidades destes testes nessa avaliação estão de acordo com os resultados de outro grupo (Sorensen *et al.*, 1997), enquanto que outros estudos comparativos discordam em relação aos valores de sensibilidade e especificidade dos ELISAs (Chittick *et al.*, 2002; Ameri-Mahabadi *et al.*, 2005).

Na tentativa de melhoras no diagnóstico da PES e na vacinação contra *M. hyopneumoniae*, vários antígenos da bactéria têm sido estudados. A região repetitiva R1 da adesina P97 (P97R1), a porção carboxi-terminal da P97 e a proteína de choque térmico P42 tiveram suas imunogenicidades avaliadas em modelo murino (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Okamba *et al.*, 2007). Já o antígeno de membrana P46, o peptídeo P97R1 e a lipoproteína Mhp366 (linhagem 232) mostraram-se promissores para diagnóstico de *M. hyopneumoniae* por ELISA (Futo *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 2009; Meens *et al.*, 2009).

1.2 Sistemas de exportação de proteínas presentes em *M. hyopneumoniae*

Entre 25 a 30% das proteínas de uma bactéria estão na membrana ou são exportadas para fora da célula (Driessen & Nouwen, 2008). Como os micoplasmas não possuem parede celular, a membrana celular é a única barreira a ser atravessada pela proteína a ser exportada. O sequenciamento dos genomas de *M. hyopneumoniae* possibilitou a identificação de sistemas de exportação de proteínas presentes nessa bactéria. Segundo os dados depositados na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2010), o *M. hyopneumoniae* possui alguns dos genes conservados pertencentes ao sistema geral de secreção (sistema Sec). Mecanismos mais especializados de secreção de proteínas, como o sistema de translocação de argininas geminadas (sistema Tat, do inglês *twin-arginine translocation pathway*) que é capaz de secretar proteínas já enoveladas (Lee *et al.*, 2006), não foram encontrados por homologia nos genomas de *M. hyopneumoniae* (Figura 2).

O sistema Sec é a principal rota para inserção de proteínas na membrana ou exportação destas (Driessen & Nouwen, 2008). Proteínas a serem translocadas pelo sistema Sec (proteínas-alvo) são direcionadas até ele de duas maneiras, uma via cotraducional e uma via pós-traducional (Rusch & Kendall, 2007). A via cotraducional é utilizada quando segmentos hidrofóbicos transmembranares são reconhecidos por um complexo denominado de partícula de reconhecimento de sinal (SRP, do inglês *signal recognition particle*), enquanto que a via pós-traducional ocorre após o reconhecimento do peptídeo-sinal (PS) pela proteína SecA. Ambas as vias direcionam as proteínas-alvo para o sistema Sec.

Em *Escherichia coli*, o SRP é composto pela proteína Ffh e 4,5S RNA, enquanto que o receptor de membrana de SRP é a proteína FtsY (Luirink & Sinning, 2004).

Resumidamente, o SRP reconhece segmentos hidrofóbicos transmembranares na proteína-alvo enquanto ela ainda está sendo sintetizada pelo ribossomo (Luirink *et al.*, 2005), e todo o complexo proteína nascente/ribossomo/SRP é direcionado para o sistema Sec. Em bactérias, a maioria das proteínas que passam por essa via são integradas na membrana pelo sistema Sec (Natale *et al.*, 2008), enquanto que em eucariotos essa é a rota mais usada para exportação de proteínas (Osborne *et al.*, 2005). Neste caso, após a translocação da proteína através da membrana, a sequência reconhecida pelo SRP é clivada pelo complexo da sinal-peptidase (Paetzel *et al.*, 2002). Em relação aos micoplasmas, existem poucos estudos sobre o funcionamento de SRP, sendo melhores caracterizados alguns componentes de SRP no *Mycoplasma mycoides*, como as proteínas Ffh e FtsY (Macao *et al.*, 1997; Farmery *et al.*, 1998; Gariani & Sauer-Eriksson, 2000).

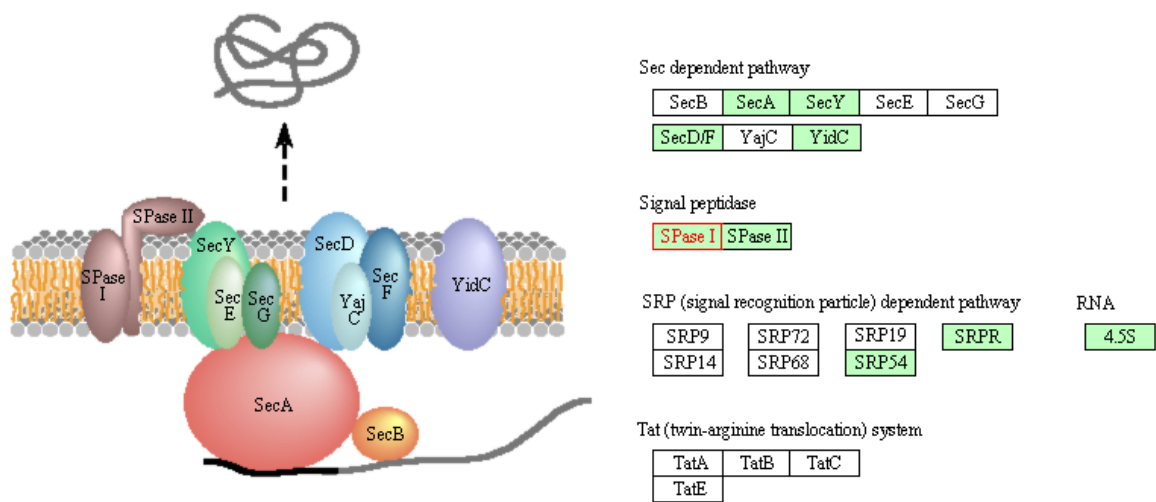


Figura 2. Componentes de mecanismos de exportação/integração de proteínas na membrana plasmática identificados em *M. hyopneumoniae* 7448. A figura mostra em destaque os componentes do sistema Sec de procarionotes, enquanto que estes são classificados de acordo com sua rota/função à direita. Em branco estão as moléculas ausentes em *M. hyopneumoniae* 7448, em verde estão às proteínas cujos genes foram

anotados no genoma da bactéria. Esta figura foi adaptada da KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mh03060+MHP7448_0026).

Proteínas que são exportadas após a sua tradução possuem um PS que é reconhecido pela proteína SecA, que por sua vez conduz a proteína-alvo à membrana e ao canal por onde esta última é translocada. O transporte das proteínas-alvos à membrana pode ser auxiliado pela chaperona SecB (Rusch & Kendall, 2007), que estabiliza as proteínas recém sintetizadas e ainda não enoveladas (Fekkes & Driessen, 1999). Uma vez em contato com o poro do sistema Sec, SecA funciona como um motor dependente de ATP que direciona a translocação da proteína-alvo (Tomkiewicz *et al.*, 2007).

Em procariotos, o poro do sistema Sec é composto em sua forma mínima pelas proteínas SecY, SecE e SecG (Driessen & Nouwen, 2008), que formam um heterodímero em forma de canal por onde a proteína-alvo é translocada. Acredita-se que o complexo de proteínas SecDF(YajC) participa em passos secundários à translocação da proteína-alvo, após a liberação da proteína do poro (Nishiyama *et al.*, 1993). Finalmente, YidC auxiliaria a inserção da proteína-alvo na membrana, atuando como uma insertase (Serek *et al.*, 2004).

Após a translocação, o PS é removido por uma das duas sinal-peptidases (SPase): sinal-peptidase I (SPase I), que cliva o PS da maioria das proteínas ou sinal-peptidase II, que processa o PS de lipoproteínas (Paetzel *et al.*, 2002). A remoção do PS por uma sinal-peptidase é a última etapa da exportação da proteína-alvo, que é liberada na forma madura para o seu destino final (Rusch & Kendall, 2007). Em *M. hyopneumoniae*, foram identificadas CDSs correspondentes a SPase I (*sipS*) e a SPase II (*lsp*), próximas e com orientações contrárias.

Os PSs reconhecidos pelo sistema Sec são caracterizados por três regiões distintas: N, H e C. O reconhecimento das duas primeiras regiões é necessário para a translocação, enquanto que a última região especifica o ponto de clivagem (Von Heijne, 1990). A região N é a mais próxima da porção amino-terminal da proteína, tem carga positiva e alta variabilidade de tamanho, podendo ter de 1 a 12 aminoácidos. Esta é seguida pela região H, que é constituída por um α -hélice hidrofóbica que pode conter de 7-15 aminoácidos. E por último, adjacente ao sítio de clivagem, localiza-se a região C do peptídeo-sinal, hidrofílica, contendo de 3-8 aminoácidos neutros (Perlman & Halvorson, 1983; Von Heijne, 1983; Kall *et al.*, 2004). A SPase I reconhece a porção final da região C, caracterizada por aminoácidos pequenos e neutros na posição -1, e aminoácidos pequenos, podendo ser maiores e alifáticos, na posição -3 (Karla *et al.*, 2005). Os resíduos mais comuns na posição -1 são Ala, Gly e Ser; enquanto que na posição -3 além dos aminoácidos citados para posição -1, são encontrados também Val, Thr, Leu e Ile (Nielsen *et al.*, 1997) (Figura 3). Devido a maior frequência de Ala nas posições -1 e -3 a especificidade das SPases I é conhecida como Ala-X-Ala (Paetzel *et al.*, 2000). Aqui, -3 e -1 são usados como sinônimos para P3 e P1 na nomenclatura de Schechter & Berger (1967).

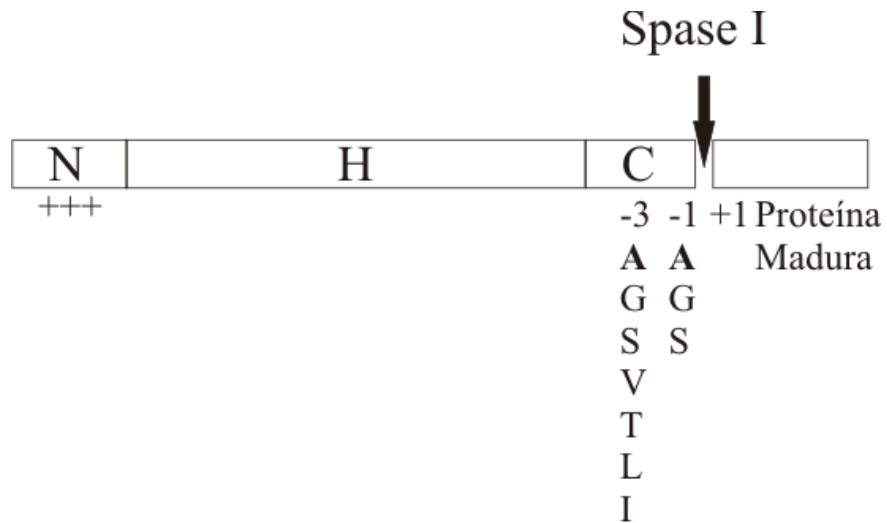


Figura 3. PS bacteriano característico. São evidenciadas as regiões N, H e C de um PS consenso e o sítio de clivagem reconhecido pela SPase I. Os aminoácidos de maior ocorrência nos sítios -1 e -3 são listados, sendo a alanina o aminoácido mais comum nestas posições. Essa figura foi adaptada de Van Roosmalen *et al.*(2004).

1.3 Sinal-peptidase I

A SPase I (E.C. 3.4.21.89) é uma serino-protease atípica de membrana, sendo insensível aos inibidores de serino-proteases (Van Roosmalen *et al.*, 2004). Seu sítio catalítico é uma díade composta por uma serina e uma lisina, se for do tipo-P, ou uma serina e uma histidina, se for do tipo-ER (Sung & Dalbey, 1992; Van Dijl *et al.*, 1992). As SPases I do tipo-P são encontradas em procariotos e organelas de eucariotos, enquanto que às do tipo-ER são encontradas em bactérias, membranas do retículo endoplasmático de eucariotos e Archaea (Van Roosmalen *et al.*, 2004). A classificação de uma determinada SPase I entre um grupo e outro depende não só da díade catalítica, mas também de sequências inseridas entre as regiões conservadas, tamanho da proteína e regiões transmembranares (Tjalsma *et al.*, 2000; Van Roosmalen *et al.*, 2004). O alinhamento de SPases I bacterianas, apresenta regiões conservadas, denominadas de caixas (do inglês *Boxes*) A-C. As caixas B e D contêm os aminoácidos catalíticos Ser e Lys, respectivamente; enquanto a caixa C contém resíduos que participam da ligação com o substrato (Paetzel *et al.*, 2002).

Para a determinação da cinética enzimática *in vitro* das SPases I se têm usado proteínas inteiras ou peptídeos sintéticos, onde as primeiras resultam em melhores cinéticas e os últimos proporcionam uma caracterização mais completa e menos laboriosa (Caulfield *et al.*, 1988; Chatterjee *et al.*, 1995; Bockstael *et al.*, 2009a). Além disso, a atividade da SPase I pode ser avaliada através de ensaios de complementação *in vivo*, onde um plasmídeo capaz de expressar a SPase I em estudo é introduzido em *E. coli* IT41 ou IT89, que possuem uma SPase I mutante termo-sensível (Inada *et al.*, 1989).

A SPase I tem sido descrita como essencial às bactérias que possuem uma única sequência de DNA codificadora (CDS) para essa enzima (Van Roosmalen *et al.*, 2004). Por estar relacionada à exportação de proteínas que participam de mecanismos de

patogenicidade das bactérias, a SPase I tem sido descrita como fator de virulência para várias espécies, como *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Bonnemain *et al.*, 2004; Lammertyn *et al.*, 2004; Kavanaugh *et al.*, 2007; Bockstael *et al.*, 2009b). Diante da importância da SPase I em processos patogênicos e para a viabilidade celular, a SPase I tem sido estudada como alvo para desenvolvimento de vacina (Rafati *et al.*, 2006) e antibióticos (Paetzel *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2007; Bockstael *et al.*, 2009b).

Nos genomas de *M. hyopneumoniae* somente uma CDS correspondente a SPase I (*sipS*) foi identificada em cada linhagem sequenciada (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). Das outras 13 espécies do gênero *Mycoplasma* cujos genomas completamente sequenciados estão disponíveis no banco de dados do GeneBank, somente 4 possuem CDSs de SPase I conservadas (Benson *et al.*, 2008). No entanto, a ausência do gene conservado não significa necessariamente a ausência de atividade de SPase I, como observado para o *Mycoplasma pneumoniae* (Catrein *et al.*, 2005), onde foi identificada uma atividade semelhante à da SPase I, porém sem a presença da CDS conservada.

2. Justificativa

Em análises genômicas preliminares (Ferreira & Castro, 2007), a SPase I foi identificada como um possível fator de virulência em *M. hyopneumoniae*, fato já sugerido ou verificado para outras bactérias patogênicas (Bonnemain *et al.*, 2004; Lammertyn *et al.*, 2004; Kavanaugh *et al.*, 2007; Bockstael *et al.*, 2009b). No entanto, não foi verificada a expressão dessa proteína em estudos funcionais envolvendo a análise em grande escala de RNAs mensageiros ou proteínas (Pinto *et al.*, 2007b; Madsen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009a; Pinto *et al.*, 2009). Logo, uma abordagem mais específica faz-se necessária para evidenciar a expressão e a relação da SPase I de *M. hyopneumoniae* (MhSPase I) com a patogenicidade da bactéria. Além disso, a determinação dos substratos e das características enzimáticas da MhSPase I forneceria informações valiosas de como esta enzima poderia estar envolvida nos processos de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, abrindo assim uma nova perspectiva para o entendimento dos mecanismos de virulência desta bactéria.

Se verificado que a SPase I é expressa em *M. hyopneumoniae*, esta provavelmente estará em contato direto com sistema imunológico suíno. Portanto, a verificação das características imunológicas da MhSPase I seria importante para o entendimento da relação imunológica entre o suíno hospedeiro e o *M. hyopneumoniae*. Caso confirmado que a MhSPase I é imunogênica e antigênica, a investigação das possíveis aplicações desta proteína no desenvolvimento de vacina e diagnóstico das infecções por *M. hyopneumoniae* seria interessante, tendo em vista a necessidade de melhoramento destes.

3. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é caracterizar a sinal-peptidase I de *M. hyopneumoniae* funcional e imunologicamente, assim como investigar a sua relação com a virulência da bactéria.

3.1 Objetivos específicos

- a) Analisar o contexto genômico e a transcrição do gene *sipS* de *M. hyopneumoniae*;
- b) Produzir a MhSPase I recombinante (rMhSPase I) e avaliar seu potencial imunogênico;
- c) Analisar a expressão da MhSPase I em diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae*;
- d) Analisar as sequências de MhSPase I de diferentes linhagens e as relações filogenéticas entre estas e enzimas ortólogas de outros micoplasmas e bactérias relacionadas a doenças respiratórias em suínos;
- e) Avaliar a antigenicidade da MhSPase I para suínos e padronizar um ensaio baseado na rMhSPase I para o imunodiagnóstico da PES;
- f) Realizar ensaios *in vitro* para confirmação da funcionalidade da rMhSPase I.

4. Resultados

Os resultados apresentados estão divididos em duas partes. A primeira parte, referente aos objetivos específicos “a” a “e”, está em forma de manuscrito a ser submetido à revista *Veterinary Microbiology*. A segunda parte, referente ao objetivo específico “f” possui metodologia e resultados próprios. A seção final da dissertação, discute de forma integrada as Partes 1 e 2.

PARTE 1

Manuscrito a ser submetido à revista *Veterinary Microbiology*.

Signal peptidase I of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a virulence factor and a potential diagnostic antigen

Lucas Moitinho-Silva, Bianca L. Heineck, Cátia S. Klein, Raquel Rebelatto, Arnaldo Zaha, Henrique B. Ferreira

O manuscrito apresentado a seguir encontra-se em fase final da redação, estando sob revisão dos coautores. Neste trabalho é descrito a relação da SPase I com a virulência de *M. hyopneumoniae*, sendo cotranscrita em operon com CDSs relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e uma CDS associada à infecção. Além disso, SPase I é mais expressa em uma linhagem patogênica, quando comparada a outra linhagem patogênica e uma não patogênica de *M. hyopneumoniae*. MhSPase I mostrou-se altamente imunogênica para camundongos e antigênica para suínos, tendo baixa identidade e similaridade de aminoácidos com outras SPases I. Finalmente, MhSPase I é indicada como um antígeno com potencial aplicação em sorodiagnóstico, sendo comparados os resultados de um ELISA sensibilizado com rMhSPase I com o teste diagnóstico ELISA-T.

Title:

Signal peptidase I of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a virulence factor and a potential diagnostic antigen

Names of Authors:

Lucas Moitinho-Silva¹, Bianca L. Heineck¹, Cátia S. Klein², Raquel Rebelatto², Arnaldo Zaha^{1,3}, Henrique B. Ferreira^{1,3*}

* corresponding author

Complete postal addresses of affiliations:

¹Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brazil.

³Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author (H. B. Ferreira) at: Caixa postal 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33087768; fax: +55 51 33087309. *E-mail address:* henrique@cbiot.ufrgs.br.

Abstract

Signal peptidase I (SPase I) is a membrane protease of the general secretory pathway, which is encoded by the *sipS* gene in *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of porcine enzootic pneumonia. In this study, the *M. hyopneumoniae* encoded signal-peptidase (MhSPase I) had its expression analyzed in virulent and avirulent strains and was immunologically characterized. It was demonstrated that the *sipS* coding DNA sequence (CDS) is possibly part of an operon, being co-transcribed along with CDSs of the aspartyl-tRNA/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase C, A and B subunits and of a hypothetical protein. A recombinant MhSPase I (rMhSPase I), expressed in *Escherichia coli*, was strongly immunogenic for mice. Immunoblot assays confirmed MhSPase I antigenicity and showed that MhSPase I is expressed by all three strains analyzed, with evidence of higher expression in pathogenic strains than in a non pathogenic strain. Polyclonal serum anti-rMhSPase I presented no detectable cross-reaction with *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyorhinis* protein extracts. Phylogenetic analysis evidenced low conservation between MhSPase I and orthologous proteins from porcine respiratory disease complex-related bacteria and other *Mycoplasma* species. The potential of a rMhSPase I-based ELISA for PEP immunodiagnosis was demonstrated. Overall, our results suggest that MhSPase I is important for *M. hyopneumoniae* virulence, and indicate that it is an antigen with potential for use in serodiagnosis and vaccination.

Keywords:

Mycoplasma hyopneumoniae, signal peptidase I, virulence, porcine enzootic pneumonia; diagnosis, ELISA.

1. Introduction

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia (PEP) and one of the primary agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC) (Mare and Switzer, 1965; Thacker, 2001). *M. hyopneumoniae* adheres to ciliated epithelium of swine respiratory tract through membrane carbohydrates and proteins, especially adhesins (Zielinski and Ross, 1993; Minion, 2002). Once colonization is established, *M. hyopneumoniae* leads to a highly contagious chronic infection that has a worldwide occurrence and is a major cause of economical losses in the pig industry. In PRDC, *M. hyopneumoniae* infections are associated with colonization of other pathogenic bacteria, such as *Bordetella bronchiseptica* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and the opportunistic bacteria *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis* and *Arcanobacterium pyogenes*, and viruses (Brockmeier et al., 2002).

Available strategies for preventing *M. hyopneumoniae* colonization, such as prophylactic antibiotic therapy or commercial vaccines, have low efficiency (Maes et al., 2008). Also, the eradication of the pathogen from a herd is compromised by re-infection. This may occur by air-borne transmission or by purchasing contaminated animals that were tested negative by ELISA (Maes et al., 2008). Although cultivation is the gold standard technique for detection of *M. hyopneumoniae* infections (Thacker, 2006), ELISA serology is the most commonly used tool to assess the health status of herds (Sibila et al., 2009). Despite the wide use of ELISA-based tests, comparative studies have shown discrepancies of specificities and sensitivities between them (Sorensen et al., 1997; Chittick et al., 2002; Ameri-Mahabadi et al., 2005; Erlandson et al., 2005). Such differences are mainly consequences of *M. hyopneumoniae* antigen variation and presentation, vaccination status of tested herds and cross-reactivity of tests.

Three strains of *M. hyopneumoniae*, two pathogenic (232 and 7448) and one non-pathogenic (J) had their genomes sequenced so far (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005). In a genomic survey for virulence (Ferreira and Castro, 2007), the *sipS* gene, coding for signal peptidase I (SPase I) in all of the three genomes, was assigned as a possible virulence factor. SPase I is a membrane-bound endopeptidase that cleaves the signal peptide of proteins, but not lipoproteins, exported by the general secretory pathway (Paetzel et al., 2002). The cleavage occurs after or during the translocation across the membrane, releasing the mature protein in the extracellular compartment. *sipS* orthologous genes were identified in only 4 of the other 13 *Mycoplasma* genomes completely sequenced to date. This may be due to low gene conservation and/or poor annotation, but is probably not consequence of actual absence of a SPase I-like activity, since SPase I is believed to be essential for bacterial viability (van Roosmalen et al., 2004; Catrein et al., 2005). SPase I have been reported as a virulence factor in *Listeria monocytogenes* (Bonnemain et al., 2004), being a target for vaccine development against *Leishmania major* (Rafati et al., 2006) and for novel antibiotic search for other pathogenic microorganisms, such as *Staphylococcus* spp. (Bockstael et al., 2009; Rao et al., 2009).

In this work, we have investigated the *sipS* gene expression in different *M. hyopneumoniae* strains and characterized the encoded SPase I (MhSPase I) as an antigen with potential for use in immunodiagnosis and vaccination. It was shown that *sipS* is part of an operon, and that MhSPase I is differentially expressed in pathogenic and non-pathogenic strains, supporting its proposition as a *M. hyopneumoniae* virulence factor. A recombinant version of MhSPase I (rMhSPase I) was strongly immunogenic to mice, and a hyperimmune serum against rMhSPase I showed no cross-reaction against protein extracts of other

Mycoplasma species. Furthermore, an rMhSPase I-based ELISA efficiently discriminated between *M. hyopneumoniae* infected and not-infected pigs in field conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Bacteria, culture conditions and protein and nucleic acids extractions

M. hyopneumoniae J (ATCC 25934), a non-pathogenic strain with reduced adhesion capacity to porcine cilia, and two pathogenic strains (7448 and 7422) were obtained as described elsewhere (Vasconcelos et al., 2005; Machado et al., 2009). *Mycoplasma flocculare* (ATCC 27716) and *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC 17981) were acquired by Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, Brazil) from the American Type Culture Collection. *Mycoplasma* cultures and protein extractions were performed according to Pinto et al. (2007). All protein quantifications were performed by Quant-iT Protein Assay Kit and Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA).

Genomic DNA from *M. hyopneumoniae* was extracted from 5 mL cultures according to standard protocol (Wilson, 2001). The removal of proteins and polysaccharides was done using phenol:chloroform and DNA was recovered yielding 3 µg. Total RNA was isolated from 25 mL of *M. hyopneumoniae* cultures using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) according to manufacturer's recommendations. Contamination with genomic DNA was avoided by treatment with RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA). All nucleic acids quantifications were done by spectrophotometry.

2.2 Operon confirmation by RT-PCR

For use on reverse transcriptase PCR (RT-PCR), primers (listed on Table 1) were designed based on *sipS* co-oriented adjacent CDSs in the *M. hyopneumoniae* 7448 genome (Vasconcelos et al., 2005; see also Fig. 1). For cDNA synthesis, total RNA (100 ng) was reversed transcribed using M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas, USA) and specific reverse primers (Fig. 1). The cDNAs were then amplified using Easy Taq DNA polymerase (LGCBIO, Brazil). As a control for DNA contamination, total RNA was amplified by PCR without a previous reverse transcription step. Cycle conditions were optimized for each primer combination and all RT-PCR products were confirmed by automatic DNA sequencing in MegaBACE (Amersham Biosciences, Sweden).

Table 1. Oligonucleotide primers used for cloning and transcriptional analysis

Name	Sequence (5'-3')
Cloning	
sipS-pGEX5'	<i>tggtccgcgtggatccccgatgtaaaatctaaaaacttaagtaac</i> ¹
sipS-pGEX3'	<i>gcgaggcagatcgtcagtcagtcattagggcccaaacacctttaatc</i> ¹
Transcriptional analysis	
A	cctcagcgaaatgatgtgtag
B	ttagggcccaaacacctttaatc
C	gtggacaagcaaaaaatattaaaacttg
D	ggtttcactgctatgaatagaattg
O	caactgaaggtgttctcatgctc
P	gcactccagatgaagatccgcc
Q	tagtggcaatccatcaattagttg
R	atctagcttatctcggaacttacc
S	ggtcttgaacaattcaatcaaggg
T	gaagtagttagtgaagaattgctcag
U	atggcattctgactttaacaacctg
V	aagtgaagttttgaagcctatttaac

¹ italic letters correspond to pGEX-4T-3 plasmid homologous sequences

2.3 Cloning of *sipS* gene, expression and purification of rMhSPase I

The complete *M. hyopneumoniae* 7448 *sipS* CDS was amplified from genomic DNA using sipS-pGEX5' and sipS-pGEX3' primers (Table 1), which have, in their 5'ends, 20 and 24 nt homologous to the pGEX-4T-3 vector (GE Healthcare, UK) cloning site, respectively. The *sipS* amplicon was cloned into pGEX-4T-3 by *in vivo* recombination in *Escherichia coli* KC8 (Parrish et al., 2004). The resultant pGEX-4T-3:*sipS* plasmid, was used for expression of rMhSPase I fused with glutathione-S-transferase (GST), connected by a thrombin cleavage site in *E. coli* BL-21 (Amersham Biosciences, Sweden). For that, pGEX-4T-3:*sipS* transformed cells were induced with 0.1 mM IPTG for 6 h at 28 °C. After induction, cells were harvested and lysed, and 0.5% sarkosyl was used for protein solubilization (Mercado-Pimentel et al., 2002). The rMhSPase I was purified by affinity chromatography in a Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, UK) followed by overnight on-column proteolytic cleavage with thrombin (Sigma, USA) at 22 °C. Elution was performed with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 with Triton X-100 added to a final concentration of 0.5%.

2.4 Immunization of mice

Five female BALB/c mice were immunized with four doses of purified rMhSPase I (25 µg/dose), administered intraperitoneally with 14-day intervals. In the first dose, the antigen was emulsified with Freund's complete adjuvant (Sigma, USA), and, in the subsequent doses, Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA) was used. Serum samples from the five mice were collected and pooled prior to immunization (pre-immune serum) and two weeks after the final boost (anti-rMhSPase I serum). Animal handle and

experiments were in agreement with Brazilian laws and the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.5 Immunoblot assays

Total protein extracts from *M. hyopneumoniae* 7448, 7422 and J strains (8 µg/lane) and from *M. flocculare* and *M. hyorhinis* (16 µg/lane) were separated by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto PVDF membranes (GE Healthcare, UK). After blocking of unspecific sites with 5% (w/v) skim milk powder in PBS 0.1% Tween 20, the membrane was incubated with anti-rMhSPase I or pre-immune serum at a 1:126,000 dilution. A second incubation was performed with an anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Sigma, USA) (1:8,000). PBS 0.1% Tween 20 was used for washing between incubations and for antibodies dilution. Recombinant GST and rMhSPase I were used as negative and positive control antigens, respectively. Antigen-antibody reactions were detected with ECL Plus kit (GE Healthcare, UK). Band intensities were analyzed by Quantity One v. 4.6.3 software (Bio-Rad, USA) and differences in intensity were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Tests. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, USA), with a 5% significance level.

2.6 SPase I amino acid sequence and phylogenetic analyses

Orthologous SPase I sequences from PRDC-related bacteria and different *Mycoplasma* species were retrieved from Molligen 2.0 (Barre et al., 2004), UniProt Knowledgebase (UniProtKB) and GenBank/EMBL databases. Alignment and phylogenies were performed using softwares available in the "a la carte mode" of Phylogeny.fr web

service (Dereeper et al., 2008). Alignment of amino acid sequences were performed by MUSCLE 3.7. Phylogenetic trees were constructed by maximum-likelihood using PhyML, and Bayesian inferences were performed using MrBayes. Multiple alignments were visualized and analyzed by GeneDoc v. 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997). Substitution models were selected by ModelGenerator v. 0.85 (Keane et al., 2006) prior to phylogenetic inferences. Bootstrap values for the maximum-likelihood estimation were calculated with five hundred replicates. The Bayesian inference was performed for 100,000 generations using four Markov Chain Monte Carlo chains, sampling every 10 generations, with the first 2,500 sampled trees discarded as "burn-in". The final tree was constructed as result of a 50% majority rule consensus. Graphical representation and edition of the phylogenetic trees were performed using MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). Prediction of transmembrane topologies was performed by web-based TMHMM Server v. 2.0 (Krogh et al., 2001).

2.7 Serum samples

Pig serum samples from herds including animals with clinical signs of PEP (field samples, n = 209) were collected between 2003 and 2006 in four Brazilian States (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul). *M. hyopneumoniae* infection serological diagnosis of field samples was performed at Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC, Brazil) by an indirect ELISA using a Tween-20 extract of *M. hyopneumoniae* proteins (10 µg/well) as antigen (ELISA-T) (Erlandson et al., 2005). Sera from pigs immunized with *M. hyopneumoniae* 7448 total protein extract (n = 3) are described elsewhere (Pinto et al., 2007) and sera from SPF pigs (n = 26) were obtained at Embrapa Suínos e Aves.

2.8 ELISA

An indirect rMhSPase I-based ELISA (ELISA-SPase I) was standardized. This assay was essentially performed as described by Virginio et al. (2003), using flat-bottom 96-well plates (MaxiSorp; Nunc, Denmark) coated with 0.3 µg/well of rMhSPase I. Diluted serum samples (1:100) were tested in triplicate, and anti-pig IgG peroxidase-conjugated antibody (Sigma, USA) (1:6,000) was used as secondary antibody. Antigen-antibody reactions were developed using H₂O₂ and *ortho*-phenilendiamine dihydrochloride as substrates. Optical density of each reaction was measured at 492 nm (OD₄₉₂) and the considered OD₄₉₂ values represent means of triplicate measures with less than 10% variation between them. The cut-off for discrimination of sera reactivity was determined by receiver-operating characteristic (ROC) curve, as the OD₄₉₂ value that presented the highest sum of sensitivity and specificity (Amagai et al., 1999). Area under ROC curve (AUC) value was calculated as a parameter of correctly discrimination of the samples (Hanley and McNeil, 1982).

Results from ELISA-SPase I and ELISA-T for the same serum samples were compared by kappa index (κ) and interpreted according to Landis and Koch (1977). Data were handled by Excel 2007 (Microsoft, USA), statistical calculations were performed by PASW Statistics 18 (SPSS, USA) and graphic representations were produced using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA).

3. Results

3.1 Transcription analysis of *sipS* operon

The *sipS* gene is located in a 4.3 kbp region conserved in the three *M. hyopneumoniae* sequenced genomes (Fig. 1A). In this region, the *sipS* CDS is followed

downstream by 4 co-oriented CDSs, namely the CDS coding for subunits C (*gatC*), A (*gatA*) and B (*gatB*) of aspartyl-tRNA/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, and a CDS (MHP0030, in 7448 strain) that codes for a hypothetical protein, in an operon-like organization. The lengths of the inter-CDS sequences within this genomic region vary from 60 bp (between *sipS* and *gatC*) and 236 bp (between *gatB* and MHP0030). The *gatC-gatA* and *gatA-gatB* CDSs present superpositions of 8 bp and 11 bp, respectively.

An RT-PCR strategy was performed to investigate whether the *M. hyopneumoniae sipS* gene is actually expressed, and whether it is co-transcribed with the downstream co-orientated CDSs in a polycistronic mRNA. Specific primers were designed for the amplification of intra and inter-CDSs segments from the putative operon region, covering the entire putative operon (see Fig. 1A). RT-PCRs were carried out with *M. hyopneumoniae* 7448 cDNA as template, and amplification was successful with all pairs of primers (Fig. 1B, 1C), while no amplification products were obtained from control reactions using total RNA prior to cDNA synthesis. Therefore, these results strongly suggest that *sipS* CDS is part of an operon, being co-transcribed along with *gatC*, *gatA*, *gatB* and MHP0030 CDSs.

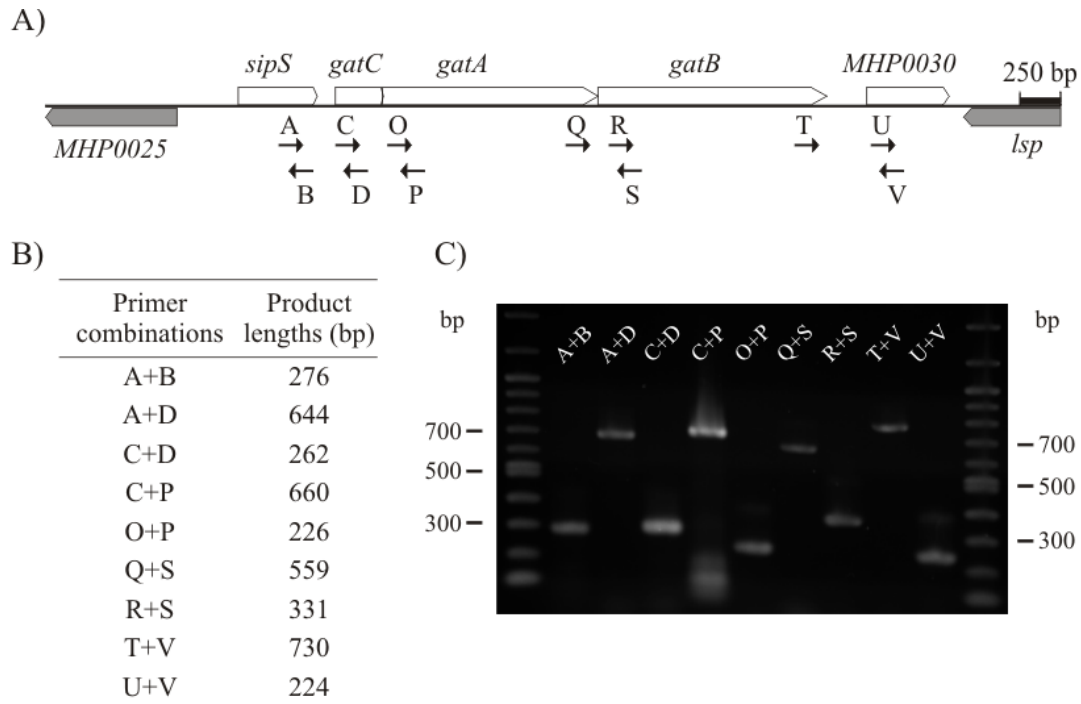


Figure 1. Structure and transcriptional analysis of the *M. hyopneumoniae* 7448 *sipS* operon. (A) Schematic representation of the genomic region containing the *sipS* operon, which comprehends 5 CDS: *sipS*, *gatC*, *gatA*, *gatB*, and MHP0030; CDSs and respective orientations are indicated by white arrows. The *sipS* operon is flanked by 2 CDSs localized on the opposite strand: the hypothetical protein (MHP0025, in 7448 strain) CDS and the lipoprotein signal peptidase CDS (*lsp*), which are represented by grey arrows. The approximate position and orientation of primers used in the transcriptional analysis are indicated by their respective letters and arrows (not in scale). (B) Primer combinations and expected RT-PCR product lengths are shown. (C) It is shown a 1% agarose gel electrophoresis loaded with RT-PCT product of primer combinations described in (B).

3.2 Expression of rMhSPase I and production of an anti-rMhSPase I serum

The complete *sipS* CDS (483 bp) was cloned into pGEX-4T-3 and overexpressed in *E. coli* BL-21 as a fusion with GST. The produced rMhSPase I was recovered after thrombin cleavage as a ~18 kDa polypeptide (Fig. 2A). This length is in agreement with the predicted size for the recombinant MhSPase I free of the GST tag and including three additional amino acids (Gly-Ser-Pro) on its N-terminus (originated from the vector encoded thrombin cleavage site). The rMhSPase I was recovered with typical yields of 5 mg of purified protein per liter of *E. coli* culture.

Mice were immunized with rMhSPase I and a specific polyclonal serum was produced. The titration of the obtained anti-rMhSPase I serum, with detectable specific reaction against the cognate antigen in dilutions of up to 1:16,000 in ELISA, demonstrated the high immunogenicity of rMhSPase I for mice.

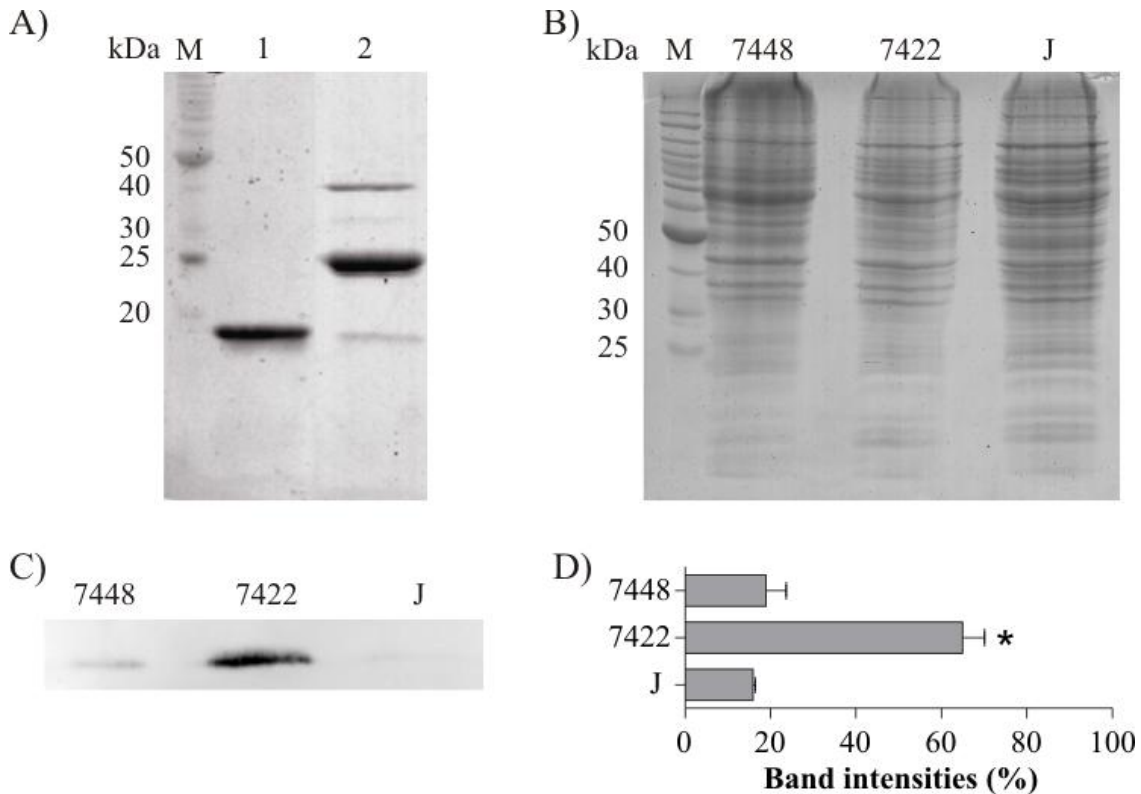


Figure 2. Recombinant MhSPase I production by *E. coli* and expression of SPase I in *M. hyopneumoniae* strains. (A) A typical result from rMhSPase I production: 10 µL of first elution (lane 1) from affinity column showing a single band of about 18 kDa in 20% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue. Lane 3 was loaded with the Sepharose 4B affinity column after thrombin cleavage and recombinant protein elution: the major bands corresponds to GST-rMhSPase I fusion (approximately 42 kDa), GST (22.9 kDa) and residual rMhSPase I. (B) For immunoblot, total protein extracts (8 µg/lane) of *M. hyopneumoniae* strains (7448, 7422 and J) were separated on 15% SDS-PAGE. Observed bands were quantified and presented no statistical difference. (C) Extract of PVDF membrane region corresponding to the area relative to 18 kDa, after immunoblotting against anti-rMhSPase I serum. The observed bands were not detected on immunoblots against pre-immune serum. (D) The bands corresponding to MhSPase I observed on immunoblot from triplicates were quantified and their graphical representation is shown. The percentage values represent relative MhSPase I band intensities in comparison to the sum of intensities of MhSPase I bands per replicate. Standard deviations and statistically significant difference

(*) according to one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Tests are shown.

We have also investigated whether our anti-rMhSPase I serum was able to recognize orthologous SPase I in two other *Mycoplasma* species, *M. flocculare* and *M. hyorhinis*, which can be also found in the respiratory tract of pigs. No specific bands were detected (data not shown), which was interpreted as evidence that the used anti-rMhSPase I do not cross react with SPase I from *M. flocculare* or *M. hyorhinis*.

3.3 SPase I expression in different *M. hyopneumoniae* strains

In order to investigate the MhSPase I expression level in pathogenic and non pathogenic strains of *M. hyopneumoniae*, immunoblot assays were conducted using the anti-rMhSPase I serum and protein extracts from *M. hyopneumoniae* 7448, 7422 and J strains (Fig. 2B). A band of the expected size of ~18 kDa for native MhSPase I was detected in all three strains, but with higher intensities in the pathogenic ones (especially in the 7442 strain, but also in the 7448 strain) than in the non-pathogenic J strain (Fig. 2C). To quantify the observed expression differences between strains, the experiment was repeated three times with protein extracts of independent bacterial cultures and the detected MhSPase I bands were densitometrically analyzed (Fig. 2D). Statistical analysis confirmed that MhSPase I is at least three times more expressed in *M. hyopneumoniae* 7442 than in the 7448 and J strains, respectively. For the 7448 strain however, although band intensity was consistently higher than that in the J strain, the observed differences were not statistically significant. Altogether, our results demonstrate differential MhSPase I expression between *M. hyopneumoniae* strains, with evidence of higher expression in a pathogenic strain when compared to another pathogenic strain and a non pathogenic one.

3.4 Sequence comparisons, structure prediction, and phylogenetic analysis of MhSPase I

The SPase I deduced amino acid sequences of *M. hyopneumoniae* 7448 and 232 strains are identical, while differing from the *M. hyopneumoniae* J SPase I in only two positions (Val24 and Ala90 in the J strain, instead of Ile24 and Val90 in the pathogenic strains) (Fig. 3). Despite of that, all three MhSPase I have the essential conserved domains for the catalytic activity of these enzymes (Boxes B, C, C', D and E), including the catalytic amino acids Ser51 (Box B) and Lys87 (Box D). Membrane topology prediction of *M. hyopneumoniae* SPase I indicates one transmembrane domain (amino acids 20 to 42) with a cytoplasmatic N-terminus and the catalytic sites exposed to extracellular matrix (data not shown).

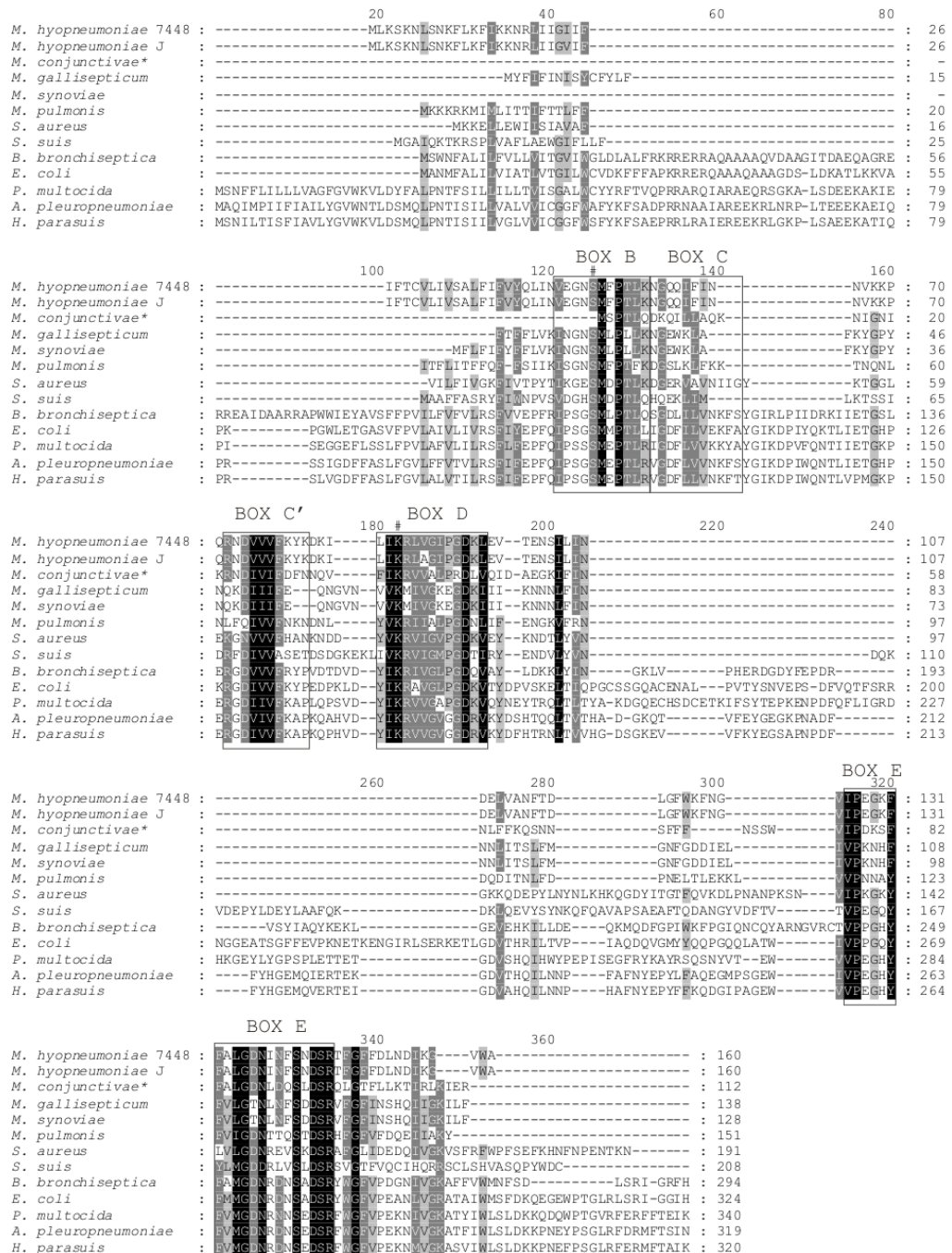


Figure 3. Multiple sequence alignment of *M. hyopneumoniae* SPase I and orthologous from *Mycoplasma* and PRDC-related bacteria. Bacteria from which complete Spase I sequences were taken and their respective UniProtKB accession numbers are: *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 (Q4A8Y6) and J strains (Q4AA57), *Mycoplasma conjunctivae* (C5J7E0), *Mycoplasma gallisepticum* (Q7NBL1), *Mycoplasma synoviae* (Q4A710), *Mycoplasma pulmonis* (Q98PT9), *Staphylococcus aureus* (P0A070), *Streptococcus suis* (A4VZ42), *Bordetella bronchiseptica* (Q7WD31), *Escherichia coli* (P00803), *Pasteurella multocida* (Q9CPH7),

Actinobacillus pleuropneumoniae (A3MZQ8) and *Haemophilus parasuis* (B8F3C6). Amino acids are shading according to conservative substitutions: black, grey and light grey representing a minimum of 100%, 80% or 60% of conservation, respectively. Catalytic amino acids (#) and conserved domains are indicated (Boxes B, C, C', D and E). *M. conjunctivae* (*) is the only specie whose SPase I does not have a catalytic serine aligned.

We performed searches for SPase I sequences in sequenced genomes from different mycoplasma species and from the main PRDC-related bacteria for alignment and construction of phylogenetic trees. Among mycoplasmas, conserved SPase I sequences were identified in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma conjunctivae*, and from some species of *Acholeplasma* and *Phytoplasma*. The *Acholeplasma* and *Phytoplasma* SPase I sequences, however, are more similar to endoplasmic reticulum-type signal peptidases than to the prokaryotic-type (data not shown) and, therefore, were not included in the performed analysis. Among PRDC-related bacteria, SPase I orthologous sequences were identified in *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. In addition, two other SPase I sequences were included in the analysis: that of the widely characterized *E. coli* SPase I and that of *Staphylococcus aureus*, a bacterium also associated with lung lesions in pigs (Liljegren et al., 2003).

The MhSPase I sequence was compared with the mentioned orthologous, with sequence identities and similarities ranging between 14%-26% and 25%-44. Despite the low conservation of the complete sequences, the comparison of MhSPase I Boxes with Boxes from orthologous indicates a higher conservation of these regions (41%-52%/61%-75% identities/similarities). In addition, SPase I sequences of all analyzed species have 100% conservation of the catalytic dyad, except for *M. conjunctivae* that seems to lack the catalytic serine (Fig. 3). As expected, *M. hyopneumoniae* SPase I is more similar to orthologous SPase I from other mycoplasmas (23%-26%/40%-44% identities/similarities) than to SPase

I orthologous from PRDC-related or other bacteria (14%-22%/25%-39% identities/similarities). When all aligned sequences were used to construct an unrooted phylogenetic tree by maximum-likelihood and Bayesian inference, two identical trees with relatively high branch support values were obtained and the consensus tree is presented (Fig. 4). Within the *Mycoplasma* genus, MhSPase I and *M. conjunctivae* SPase I were grouped together, apart of a second group formed by *M. synoviae* and *M. gallisepticum* SPases I. As expected, in longer range comparisons, SPase I sequences grouped according to respective phyla, with *Tenericutes* (*Mycoplasma*) SPase I closer to *Firmicutes* (*S. aureus* and *S. suis*) than to *Proteobacteria* (*B. bronchiseptica*, *E. coli*, *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* and *H. parasuis*). The phylum proximity also reflects the predicted membrane topology of the corresponding SPase I, since *Tenericutes* and *Firmicutes* have SPase I with a single N-terminus transmembrane domain, while *Proteobacteria* have SPase I presenting two or three predicted transmembrane segments (data not shown).

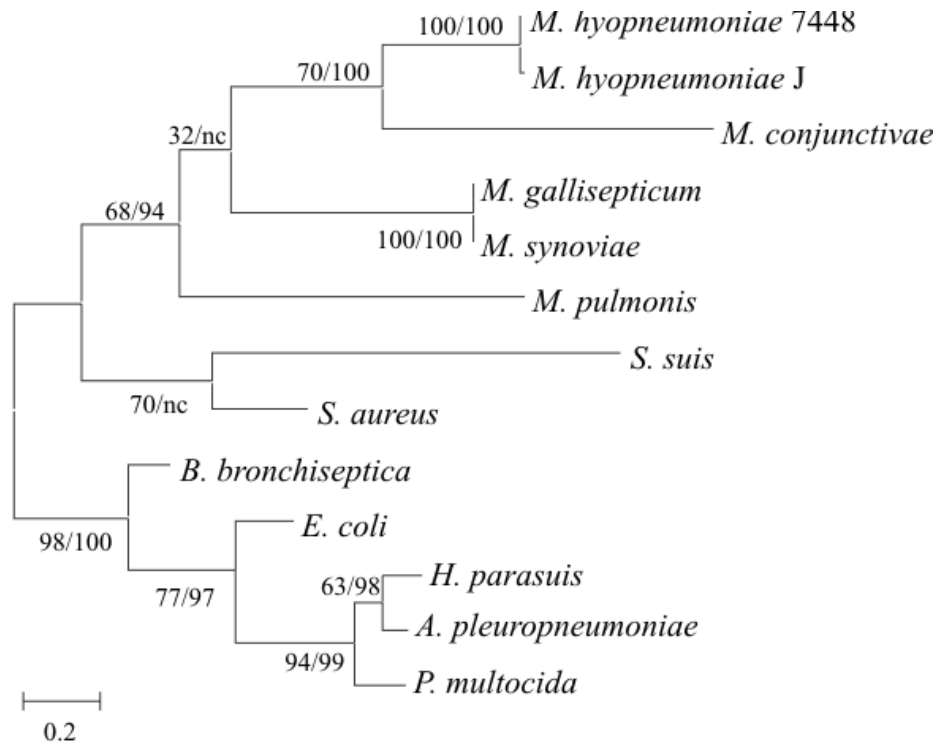


Figure 4. Phylogeny of *M. hyopneumoniae* SPase I and orthologous from *Mycoplasma* and PRDC-related bacteria. It is shown the consensus tree of two identical trees obtained from maximum-likelihood and Bayesian inference methods applied to investigate the phylogenetic relations between SPase I orthologous. Bacteria from which complete Spase I sequences were taken and their respective UniProtKB accession numbers are: *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 (Q4A8Y6) and J strains (Q4AAS7), *Mycoplasma conjunctivae* (C5J7E0), *Mycoplasma gallisepticum* (Q7NBL1), *Mycoplasma synoviae* (Q4A710), *Mycoplasma pulmonis* (Q98PT9), *Staphylococcus aureus* (P0A070), *Streptococcus suis* (A4VZ42), *Bordetella bronchiseptica* (Q7WD31), *Escherichia coli* (P00803), *Pasteurella multocida* (Q9CPH7), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (A3MZQ8) and *Haemophilus parasuis* (B8F3C6). Bootstrap values (500 replications) are shown for each branch, followed by Bayesian posterior probabilities (nc, not calculated).

3.5 Standardization and preliminary evaluation of a rMhSPase I-based ELISA for detection of *M. hyopneumoniae* infections

The ELISA-SPase I was standardized using sera from SPF pigs (n = 26), pigs immunized with *M. hyopneumoniae* total protein extract (n = 3) and field samples with serological confirmation of *M. hyopneumoniae* infection by ELISA-T (n = 63). ROC curve analysis was performed to determine as a cut-off value an OD₄₉₂ of 0.55. This cut-off resulted in a good discriminatory capacity (AUC = 0.918) for the ELISA-SPase I, with

sensitivity of 85% and specificity of 100%. As expected, control sera from SPF pigs and pigs immunized with *M. hyopneumoniae* total protein extract were diagnosed as negative and positive, respectively. Among field samples with positive result in ELISA-T, 53 (84.1%) were also positive in ELISA-SPase I, while the other 10 samples (15.9%) tested negative (Fig. 5A). To further investigate the degree of concordance between ELISA-SPase I and ELISA-T, we also assessed by ELISA-SPase I field samples that tested negative in ELISA-T, although coming from *M. hyopneumoniae* infected herds (n = 146). In this latter assay, ELISA-SPase I classified as positive almost half of the (74; 50.6%) negative samples in ELISA-T (Fig. 5B). Overall, our data demonstrated a fair agreement between ELISA-SPase I and ELISA-T results in the assessment of the same field samples, with a resultant kappa index of the comparison of 0.26 (Table 2).

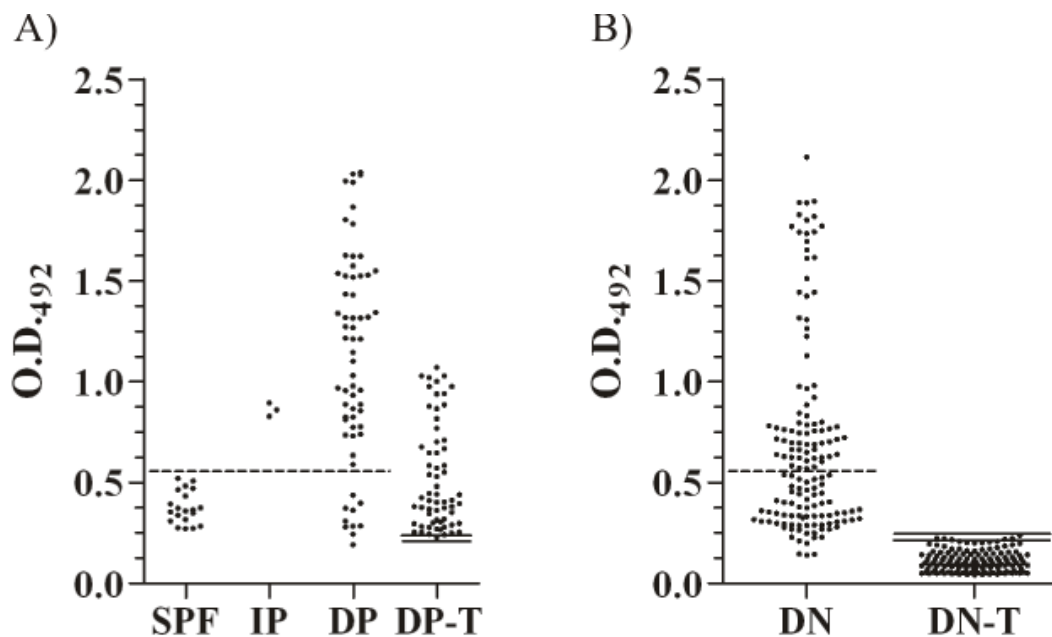


Figure 5. Standardization of ELISA-SPase I and immunoreactivity of ELISA-SPase I and ELISA-T for field samples. (A) Twenty six sera from specific pathogen-free pigs (SPF), three sera from pigs immunized with *M. hyopneumoniae* 7448 protein extract (IP) and 63 field samples with serological diagnosis of *M. hyopneumoniae* infection by ELISA-T (DP) were used for standardization of ELISA-SPase I. The ELISA-SPase I cut-off was determined by ROC curve analysis as 0.55 O.D.₄₉₂ (dashed line). (B) Further, field samples coming from *M. hyopneumoniae* infected herds but tested negative in ELISA-T (DN) were

tested in ELISA-SPase I. For comparison, ELISA-T results are shown for DP (DP-T) and DN (DN-T) sera, where ELISA-T cut-off O.D.₄₉₂ values range from 0.22 to 0.24 (double line).

Table 2. Comparison between ELISA-SPase I and ELISA-T results for field samples

Kappa value: 0.259		ELISA-T		Total
		Positives	Negatives	
ELISA-SPase I	Positives	53	74	127
	Negatives	10	72	82
Total		63	146	209

4. Discussion

SPase I is an essential protein that has been isolated and characterized in Eukarya (Rafati et al., 2004), Bacteria (Zwizinski and Wickner, 1980; van Roosmalen et al., 2004) and Archaea (Ng et al., 2007). Among the whole sequenced genomes of 14 *Mycoplasma* species current available in NCBI Genome Database, only 5 present a conserved SPase I gene. However, the absence of a conserved SPase I gene does not imply in the absence of the corresponding activity, as observed for *M. pneumoniae* (Catrein et al., 2005). To our knowledge, this work on *M. hyopneumoniae* SPase I was the first to analyze the transcription and to immunologically characterize the product of a SPase I gene from a *Tenericutes* species.

In bacteria, some SPase I genes have been reported as part of operons along with unrelated genes, such as 7,8-dihydro-8-oxo-guanine-triphosphatase, NADH dehydrogenase I chain F, RNA III, GTP-binding protein and CDSs of hypothetical proteins (Rauhut et al., 1996; Parro et al., 1999; Rahman et al., 2003; Bonnemain et al., 2004; Lammertyn et al.,

2004). Our results strongly suggest that *sipS* gene is organized in a conserved operon among *M. hyopneumoniae* strains, but the *M. hyopneumoniae sipS* operon CDS composition is distinct from all other Spase I gene operons from other bacteria, further demonstrating the lack of conservation among these bacteria operons.

M. hyopneumoniae genome has the enzymes to produce all aminoacyl-tRNAs (Arraes et al., 2007), and, like other bacteria, *M. hyopneumoniae* forms Asn-tRNA and Gln-tRNA by the activity of a heterotrimetric amidotransferase encoded by *gatC-gatB-gatA* CDSs (Sheppard and Soll, 2008). Even though there is no apparent functional relation between *sipS* and *gatC-gatB-gatA* CDSs, the operon organization may implicate some advantage in transcribing these genes at the same level. In previous transcriptomic studies of *M. hyopneumoniae*, *gatA* was found to be up-regulated in infection conditions compared to culture conditions (Madsen et al., 2008). The same result was obtained for *secA* CDS, that encodes a component of the general secretory pathway. Since *gatA* and *sipS* are transcribed together, we can infer that *sipS* would be also overexpressed in the same condition, although it was not identified as such. Taken together, the co-transcription of *sipS* along with *gatA* and the overexpression of *gatA* and *secA* during infection suggest an integrated regulation of protein synthesis and exportation when *M. hyopneumoniae* is in contact with the host.

In search for virulence factors of *M. hyopneumoniae*, comparative proteomic studies have been recently carried out for pathogenic and non-pathogenic strains (Li *et al.*, 2009a; Pinto *et al.*, 2009). These and a previous prospective proteomic study (Pinto *et al.*, 2007) failed to detect MhSPase I expression. Here, we demonstrated that MhSPase I is expressed in all three *M. hyopneumoniae* strains analyzed, with evidence of higher expression in the pathogenic strain 7442 strain. Its higher expression is suggestive of a higher capacity of protein exportation, which may be one of the factors contributing for the virulence of the

pathogenic strains. Such capacity would favor colonization, which relies on proteins that are exported and mediate important bacterium-host interaction (Li *et al.*, 2009b). Other bacterial SPase I have been reported to be involved in important mechanisms of virulence, such as quorum sensing, biofilm development and expression and maturation of virulence factors (Bonnemain *et al.*, 2004; Lammertyn *et al.*, 2004; Kavanaugh *et al.*, 2007).

The phylogenetic inference proposed recognizes the three phyla *Tenericutes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*, and is in agreement with the evolutionary history of *Mycoplasma* species (Barre *et al.*, 2004; Oshima and Nishida, 2007), including a horizontal gene transference event between *M. gallisepticum* and *M. synoviae* (Vasconcelos *et al.*, 2005). This phylogeny indicates that there have not been a successful horizontal SPase I CDS transference between *M. hyopneumoniae* and PRDC-related bacteria, where MhSPase I is more similar to SPases I from other mycoplasmas than from PRDC-related bacteria. Despite the high conservation of the catalytic Boxes among SPases I studied, the singularity of MhSPase I sequence observed was corroborated by our immunoblot analysis, in which an anti-rMhSPase I serum did not cross-react with *M. flocculare* and *M. hyorhinis* protein extracts, although these are the closest mycoplasma porcine species to *M. hyopneumoniae* (Stemke *et al.*, 1992) and an important source of antigen cross-reactivity (Freeman *et al.*, 1984; Armstrong *et al.*, 1987).

Our results indicate that MhSPase I is also a possible target for antibiotic development and a good candidate for a vaccine formulation, since it is highly immunogenic, at least for mice, and with 73.7% of the protein (118 aa) exposed on the surface, including the catalytic site whose activity is related to virulence. Due to its importance in virulence, SPase I from different bacterial pathogens have been used as targets for the development of antibacterial compounds (Paetzel *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2009) and

vaccine formulation (Rafati et al., 2006). Our group is currently working on the characterization of the cellular immune response of mice against rMhSPase I to further investigate protective potential of the immunization with this antigen.

For the evaluation of rMhSPase I antigenicity and the potential of this recombinant antigen for use in PEP serodiagnosis we standardized an ELISA-SPase I and compared its efficiency to detect *M. hyopneumoniae* infection with that of ELISA-T, which is currently being used in the routine of PEP serodiagnosis in Brazil. The specificity of the standardized assay was suggested by the fact that SPF pig sera tested negative. Besides, ELISA-SPase I specificity was also corroborated by our immunoblot experiment, in which an anti-rMhSPase I did not recognize SPase I in protein extract from *M. flocculare* and *M. hyorhinis*, and by the relatively low degree of conservation between MhSPase I and SPase I sequences from other PRDC-related organisms. Regarding sensitivity, ELISA-SPase I failed to detect antibodies in a fraction (~16%) of ELISA-T positive field sera. On the other hand, it detected as positive almost half of the ELISA-T negative field sera. ELISA-T is regarded as specific according to previous report (Erlandson et al., 2005), but the use of a crude antigen extract with field samples carrying cross-reactive bacteria often result in false positive results (Bereiter et al., 1990). Moreover, specific antigens have a relatively poor representation in crude *M. hyopneumoniae* antigen preparations, and this may result in false negative results (Erlandson et al., 2005). Considering this, it is likely that at least part of the positive ELISA-T results not confirmed by ELISA-SPase I were actually false positives. Besides, it is reasonable to assume that the limited agreement between ELISA-SPase I and ELISA-T results in the analysis of field sera was mainly due to a higher sensitivity of the ELISA-SPase I, assumption that is corroborated by preliminary time course analysis of experimentally *M. hyopneumoniae* infected pigs showing that ELISA-SPase I detects

seroconversions earlier than ELISA-T (data not shown). Therefore, our results indicate that the ELISA-SPase I is apparently more specific and sensitive than ELISA-T. Further assessment to confirm specificity and sensitivity of ELISA-SPase I will be carried by using serum samples from pigs with *M. hyopneumoniae* infection confirmed by postmortem immunohistological analyses.

In conclusion, the *M. hyopneumoniae sipS* gene is possibly organized in an operon, and its product, MhSPase I, is expressed in all three analyzed strains. Stronger expression in a pathogenic strain in culture conditions further suggests a possible role of MhSPase I in *M. hyopneumoniae* virulence. MhSPase I is antigenic and its recombinant version, expressed in *E. coli*, is highly immunogenic for mice. These immunological properties, along with the surface localization of the enzyme and exposure of its active sites, indicate that it can be a good diagnostic or vaccinal antigen. Studies involving *in vitro* assays with putative substrates will be necessary to demonstrate MhSPase I functionality, to identify its targets for exporting and to shed light on the poorly understood protein export process of *M. hyopneumoniae* and its relation to virulence.

Acknowledgments:

We thank M.Sc. B. G. F. Bittencourt and M.Sc. S. S. Weber for mycoplasma cultures and for the help with *M. hyopneumoniae* nucleic acid extractions, respectively. We also thank M.Sc. C. X. Machado for the critical reading of the manuscript. The *E. coli* KC8 strain was a kind gift from Dr. R. L. Finley, Jr. L. Moitinho-Silva was a recipient of CNPq M.Sc. fellowship. This work was supported by grants from MCT/CNPq.

References

- Amagai, M., Komai, A., Hashimoto, T., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Yamada, T., Kitajima, Y., Ohya, K., Iwanami, H., Nishikawa, T., 1999. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 140, 351-357.
- Ameri-Mahabadi, M., Zhou, E.M., Hsu, W.H., 2005. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 61-64.
- Armstrong, C.H., Freeman, M.J., Sands-Freeman, L., 1987. Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*--practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Isr. J. Med. Sci.* 23, 654-656.
- Arraes, F.B.M., Carvalho, M.J.A.d., Maranhão, A.Q., Brígido, M.M., Pedrosa, F.O., Felipe, M.S.S., 2007. Differential metabolism of *Mycoplasma* species as revealed by their genomes. *Genetics and Molecular Biology* 30, 182-189.
- Barre, A., de Daruvar, A., Blanchard, A., 2004. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res.* 32, D307-310.
- Bereiter, M., Young, T.F., Joo, H.S., Ross, R.F., 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet. Microbiol.* 25, 177-192.
- Bockstael, K., Geukens, N., Rao, C.V., Herdewijn, P., Anne, J., Van Aerschot, A., 2009. An easy and fast method for the evaluation of *Staphylococcus epidermidis* type I signal peptidase inhibitors. *J. Microbiol Methods* 78, 231-237.
- Bonnemain, C., Raynaud, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Frehel, C., Lety, M.A., Berche, P., Charbit, A., 2004. Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 51, 1251-1266.
- Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., Thacker, E.L., 2002. Porcine Respiratory Disease Complex. In: Borgden, K.A., Guthmiller, J.M. (Eds.), *Polymicrobial Diseases Involving Viruses and Bacteria*, AMS, Washington, DC, pp. 231-258.
- Catrein, I., Herrmann, R., Bosserhoff, A., Ruppert, T., 2005. Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase. *FEBS J.* 272, 2892-2900.
- Chittick, W., Holck, J.T., Polson, D.D., Luehrs, A., Miller, S., 2002. Capabilities of two *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA serologic assays. In: *Proceeding of the 17th IPVS Congress*, Ames, Iowa, USA, p. 251.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465-469.
- Erlandson, K.R., Evans, R.B., Thacker, B.J., 2005. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Swine Health Prod.* 13, 198-203.
- Ferreira, H.B., Castro, L.A.d., 2007. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genetics and Molecular Biology* 30, 245-255.
- Freeman, M.J., Armstrong, C.H., Sands-Freeman, L.L., Lopez-Osuna, M., 1984. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M.*

- flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can. J. Comp. Med.* 48, 202-207.
- Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29-36.
- Kavanaugh, J.S., Thoendel, M., Horswill, A.R., 2007. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol. Microbiol.* 65, 780-798.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McLnerney, J.O., 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567-580.
- Lammertyn, E., Van, M.L., Meyen, E., Lebeau, I., De, B.E., Anne, J., Geukens, N., 2004. Molecular and functional characterization of type I signal peptidase from *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 150, 1475-1483.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Li, Y.Z., Ho, Y.P., Chen, S.T., Chiou, T.W., Li, Z.S., Shiuan, D., 2009a. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Mosc)* 74, 215-220.
- Li, Y.Z., Ho, Y.P., Chen, S.T., Shiuan, D., 2009b. Proteomic Analysis of the Interactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Tracheal Ciliated Cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.*
- Liljegren, C.H., Aalbaek, B., Nielsen, O.L., Jensen, H.E., 2003. Some new aspects of the pathology, pathogenesis, and aetiology of disseminated lung lesions in slaughter pigs. *APMIS* 111, 531-538.
- Machado, C.X., Pinto, P.M., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2009. A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H₂O₂ detoxification. *Microbiology* 155, 3411-3419.
- Madsen, M.L., Puttamreddy, S., Thacker, E.L., Carruthers, M.D., Minion, F.C., 2008. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* 76, 658-663.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 126, 297-309.
- Mare, C.J., Switzer, W.P., 1965. New Species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a Causative Agent of Virus Pig Pneumonia. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 60, 841-846.
- Mercado-Pimentel, M.E., Jordan, N.C., Aisemberg, G.O., 2002. Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. *Protein Expr. Purif.* 26, 260-265.
- Minion, F.C., 2002. Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Front. Biosci.* 7, d1410-1422.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J. Bacteriol.* 186, 7123-7133.
- Ng, S.Y., Chaban, B., VanDyke, D.J., Jarrell, K.F., 2007. Archaeal signal peptidases. *Microbiology* 153, 305-314.

- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by author.
- Oshima, K., Nishida, H., 2007. Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. *J. Mol. Evol.* 65, 249-258.
- Paetzel, M., Dalbey, R.E., Strynadka, N.C., 2000. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. *Pharmacol. Ther.* 87, 27-49.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., Dalbey, R.E., 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.* 102, 4549-4580.
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., Finley, R.L., Jr., 2004. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J. Proteome. Res.* 3, 582-586.
- Parro, V., Schacht, S., Anne, J., Mellado, R.P., 1999. Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. *Microbiology* 145 (Pt 9), 2255-2263.
- Pinto, P.M., Chemale, G., de Castro, L.A., Costa, A.P., Kich, J.D., Vainstein, M.H., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2007. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet. Microbiol.* 121, 83-93.
- Pinto, P.M., Klein, C.S., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2009. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci.* 7, 45.
- Rafati, S., Ghaemimanesh, F., Zahedifard, F., 2006. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine* 24, 3290-3297.
- Rafati, S., Salmanian, A.H., Taheri, T., Masina, S., Schaff, C., Taslimi, Y., Fasel, N., 2004. Type I signal peptidase from *Leishmania* is a target of the immune response in human cutaneous and visceral leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135, 13-20.
- Rahman, M.S., Simser, J.A., Macaluso, K.R., Azad, A.F., 2003. Molecular and functional analysis of the lepB gene, encoding a type I signal peptidase from *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia typhi*. *J. Bacteriol.* 185, 4578-4584.
- Rao, S., Bockstael, K., Nath, S., Engelborghs, Y., Anne, J., Geukens, N., 2009. Enzymatic investigation of the *Staphylococcus aureus* type I signal peptidase SpsB - implications for the search for novel antibiotics. *FEBS J.* 276, 3222-3234.
- Rauhut, R., Jager, A., Conrad, C., Klug, G., 1996. Identification and analysis of the rnc gene for RNase III in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res.* 24, 1246-1251.
- Sheppard, K., Soll, D., 2008. On the evolution of the tRNA-dependent amidotransferases, GatCAB and GatDE. *J. Mol. Biol.* 377, 831-844.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segales, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221-231.
- Sorensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A.A., Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E., Pedersen, M.W., 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 54, 23-34.
- Stemke, G.W., Laigret, F., Grau, O., Bove, J.M., 1992. Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and

- Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 220-225.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.
- Thacker, E.L., 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17, 551-565.
- Thacker, E.L., 2006. Mycoplasmal Disease. In: Straw, B.E., Zimmermann, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine, Iowa State University Press, Ames, pp. 701-717.
- van Roosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D., Tjalsma, H., Dubois, J.Y., Bron, S., van Dijl, J.M., Anne, J., 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1694, 279-297.
- Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G., Almeida, R., ves-Filho, L., Assuncao, E.N., Azevedo, V.A., Bogó, M.R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambros, B.P., Dellagostin, O.A., Falcao, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S., Frias, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimaraes, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F., Lopes, M.I., Loreto, E.L., Madeira, H.M., Manfio, G.P., Maranhao, A.Q., Martinkovics, C.T., Medeiros, S.R., Moreira, M.A., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolas, M.F., Oliveira, S.C., Paixao, R.F., Pedrosa, F.O., Pena, S.D., Pereira, M., Pereira-Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C., Santos, F.R., Schmitt, R., Schneider, M.P., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanetz, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares, C.M., Souza, K.R., Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B., Teixeira, S.M., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J., Zaha, A., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. J. Bacteriol. 187, 5568-5577.
- Virginio, V.G., Hernandez, A., Rott, M.B., Monteiro, K.M., Zandonai, A.F., Nieto, A., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2003. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. Clin. Exp. Immunol. 132, 309-315.
- Wilson, K., 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 2, Unit 2.4.
- Zielinski, G.C., Ross, R.F., 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am. J. Vet. Res. 54, 1262-1269.
- Zwizinski, C., Wickner, W., 1980. Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255, 7973-7977.

PARTE 2

Ensaio funcional da sinal-peptidase I recombinante de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Nesta parte são apresentados os resultados sobre a predição de PSs clivados pela MhSPase I. Em seguida, são apresentadas as condições testadas na tentativa de estabelecer um ensaio de clivagem com a rMhSPase I e PSs sintéticos. Não foi observada a atividade proteolítica de rMhSPase I sobre os PSs sintéticos, sendo necessárias novas estratégias para a caracterização da MhSPase I

1. Materiais e métodos

1.1 Predição e síntese de PSs

A predição de PSs foi desenvolvida a partir de análise *in silico* de proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 preditas de serem clivadas pela SPase I feita previamente pelo nosso grupo de pesquisa (C. V. Bizarro & H. B. Ferreira, comunicação pessoal). A identificação foi feita pelos seguintes programas: SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), SOSUISignal (Gomi *et al.*, 2004), PrediSi (Hiller *et al.*, 2004), SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2005) e Lipop (Juncker *et al.*, 2003). Essa análise resultou na identificação de 28 proteínas que seriam secretas pelo sistema Sec, cujos PSs seriam clivados pela SPase I.

A partir das proteínas preditas de serem processadas pela SPase I, as predições dos PSs e seus respectivos sítios de clivagem foram feitas pelos programas: Phobius (Kall *et al.*, 2004), PrediSi, RPSP (Plewczynski *et al.*, 2008), SignalBlast (Frank & Sippl, 2008) e SignalP 3.0. Visto que não existe nenhum dado publicado a respeito de PSs em *Mollicutes*, as predições foram baseadas em PSs de bactérias gram-positivas, quando o programa fornecia a opção.

As predições obtidas foram agrupadas em ordem de confiabilidade seguindo critérios baseados na concordância das predições da extensão do PS, e consequente posição do sítio de clivagem, para cada proteína. Os critérios e grupos de confiabilidade foram:

a) Proteínas de confiabilidade 1: proteínas cujas predições da extensão dos respectivos PSs apresentaram moda com desvio padrão (DP) menor que 3 resíduos.

b) Proteínas de confiabilidade 2: proteínas cujas predições da extensão dos respectivos PSs apresentaram moda com DP acima de 3.

c) Proteínas de confiabilidade 3: proteínas cujas predições da extensão dos respectivos PSs apresentaram média com DP menor que 3.

d) Proteínas de confiabilidade 4: proteínas cujas predições da extensão dos respectivos PSs apresentaram média com DP maior que 3.

O alinhamento dos PSs de cada grupo de confiabilidade foi feito por MUSCLE v. 3.6 (Edgar, 2004) e visualizado por GeneDoc v. 2.6.002 (Nicholas & Nicholas, 1997). Para a seleção de PSs para síntese e posterior aplicação em ensaios de clivagem utilizou-se 3 critérios: (1) PSs pertencentes às proteínas de confiabilidade 1; (2) proteínas de possível relação com a patogenicidade do *M. hyopneumoniae*; (3) porção do PS condizente com a capacidade de síntese e capaz de ser processada pela SPase I de acordo com a literatura.

Foram sintetizados peptídeos correspondentes a porções dos PSs das proteínas P97 (YP 287595,1), P97-like (YP 287669,1) e P216 (YP 287885,1) acrescidos dos aminoácidos +1, +2 e +3 relativos à porção amino-terminal da proteína madura. Assim, os PSs sintéticos foram nomeados de acordo com as proteínas de origem e correspondem aos aminoácidos 9 ao 35 da P97, 3 ao 28 da P97-like e 5 a 32 da P216 (ver Figura 6). Os PSs escolhidos foram sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Luiz Juliano Neto, do departamento de Biofísica, da Universidade Federal de São Paulo. Os peptídeos obtidos foram suspensos em 100% de DMSO (dimetilsulfóxido), com concentração variando de 10-15 mM e armazenados em -20 °C até o uso.

1.2 Purificação da rMhSPase I para ensaios funcionais

Para a expressão da rMhSPase I funcional, o plasmídeo recombinante contendo a CDS da *sipS* (pGEX-4T-3:*sipS*) foi transformado por eletroporação em *E. coli* BL-21

pLysE. As células transformadas foram cultivadas em meio Circle-Grow (Q-BIOgene, EUA) e induzidas por 0.1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) à temperatura de 28 °C durante 6 h. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas em PBS na proporção de 37,5 mL de PBS para cada litro de cultura de *E. coli*. A lise celular foi feita por sonicação a 75 Hz em banho de gelo, seguida da solubilização da rMhSPase I com 1% do detergente não iônico Triton X-100 (Sigma) por 30 min em banho de gelo sob agitação branda. A purificação e eluição em PBS adicionado de 0,5% de Triton X-100 foram realizadas de acordo com o item 2.3 do manuscrito incluído na seção de resultados da Parte 1 desta dissertação.

1.3 Ensaio de clivagem *in vitro* de PSs sintéticos pela rMhSPase I

Todas as reações de clivagem I foram realizadas com frações recém purificadas de rMhSPase I (uso no mesmo dia da purificação) utilizando PSs sintéticos (P97, P97-like e P216) como substratos. As reações de clivagem duraram 24 h cada, à temperatura de 37 °C. As variáveis testadas foram:

- a) Concentração da rMhSPase I: 10, 10^{-1} ou 10^{-3} μ M;
- b) Concentração de PSs sintéticos: 66, 100, 200 ou 250 μ M;
- c) Tampão e pH: 100 mM de acetato de sódio (pH 5), 25 mM de Tris-Cl (pH 7), 50 mM de Tris-Cl (pH 8) ou 25 mM de fosfato de sódio (pH 8);
- d) Presença ou ausência de detergente 1% Triton-X 100;
- e) Concentração de DMSO residual: 0,6 e 2,5%.

Alternativamente, usou-se extrato celular fresco de *M. hyopneumoniae* 7448 (83 µg/mL) em reações com 100 e 200 µM de substrato. Também foi avaliada a possibilidade de clivagem em ambiente hidrofóbico obtido do pellet resultante da centrifugação do extrato celular de *M. hyopneumoniae* por 40 min a 4 °C. O pellet foi coletado, submetido à fervura por 12 min e após resfriamento foram adicionados o substrato (2 mM) e a rMhSPase I (13 µM).

As clivagens foram paradas adicionando-se 20% de TCA (ácido tri-cloro acético)/acetona gelado. Após precipitação à -20 °C por 16 h, o pellet resultante foi lavado com acetona gelada. Em seguida ao descarte da acetona, o pellet foi ressuspendido em 0,1% de ácido fórmico. As clivagens foram analisadas por espectrometria de massas em MALDI/TOF (ionização/dessorção de matriz assistida por laser, tempo-de-vôo; do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization, Time of Flight*).

2. Resultados

2.1 PSs de *M. hyopneumoniae* cliváveis pela SPase I

Os PSs preditos e suas respectivas classificações estão representados na Figura 4. Proteínas de confiabilidade 1 e proteínas de confiabilidade 2 apresentaram sítios de clivagem de seus PSs alinhados e correspondentes aos sítios de clivagem clássicos para SPase I bacteriana. As características observadas para a maioria dos sítios de clivagem dos PSs de confiabilidade 1 e 2 foram: (a) uma Ala na posição -1 ou um aminoácido pequeno (Asn, Gly, Val); (b) A posição -3 teve uma maior variação apresentando maiores frequências de aminoácidos pequenos Ala, Val e Ser (Figura 5).

Os PSs referentes às proteínas de confiabilidade 1, 2 e 3 apresentaram uma estrutura geral característica: a porção N contendo aminoácidos polares e positivos; porção H contendo aminoácidos hidrofóbicos, alifáticos e pequenos; e a porção C contendo aminoácidos pequenos. A média dos PSs para as proteínas de confiabilidade 1, 2 e 3 foi de 30 aminoácidos por PS, com uma moda de 28 aminoácidos e DP de 5,75. Apesar dos PSs das proteínas de confiabilidade 4 apresentarem estrutura geral condizente com PSs processados por SPase I, os dados correspondentes ao tamanho do PS e a frequência de aminoácidos no sítio catalítico não foram utilizados.

Uma característica importante observada para algumas proteínas [as lipoproteínas (YP 287761,1 e YP 287760,1), o antígeno de superfície 46K (YP 287902,1), a proteína hipotética MHP7448 0661 (YP 288046,1) e a prolipoproteína p65 (YP 288041,1)] é a presença de uma cisteína próxima ao sítio de clivagem. Essa característica é típica de PSs

processados por SPase II, onde a cisteína +1 é o local de modificação lipídica *N*-acil-S-diacilgliceril-Cys (Babu *et al.*, 2006).

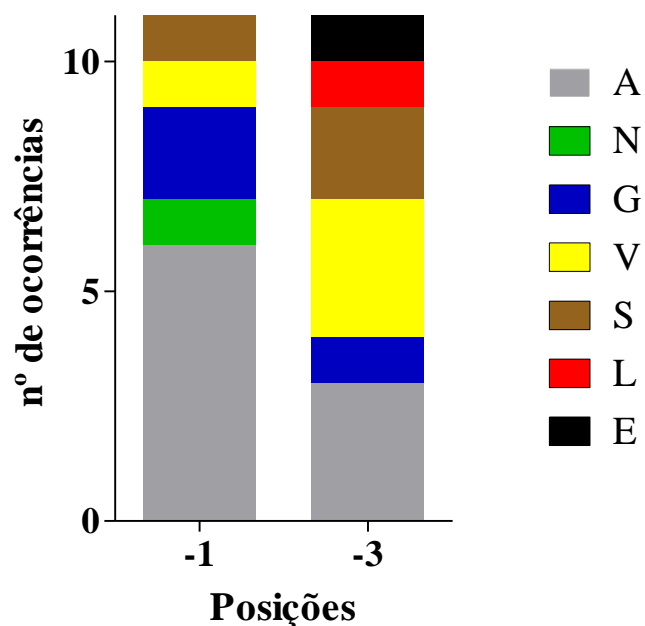


Figura 5. Frequência de aminoácidos nas posições -1 e -3 dos PSs de proteínas de confiabilidade 1 e 2. São representadas as ocorrências de cada aminoácido por posição -1 e -3 nos sítios de clivagem dos PSs preditos. As proteínas cujos peptídeos-sinal foram utilizados para análise do sítio de clivagem foram: lipoproteína (YP 287761,1), proteína P97-like (YP 287669,1), proteína P97 (YP 287595,1), possível proteína de superfície P216 (YP 287885,1), proteína hipotética MHP7448 0022 (YP 287422,1), lipoproteína (YP 287760,1), proteína P97 (YP 287506,1), proteína hipotética MHP7448 0461 (YP 287851,1), antígeno de superfície 46K (YP 287902,1), proteína hipotética MHP7448 0342 (YP 287737,1), proteína hipotética MHP7448 0661 (YP 288046,1).

Tabela 1. Predição das massas moleculares dos PSs sintéticos antes e após a clivagem pela rMhSPase I

PSs sintéticos	Massas dos peptídeos íntegros (Da)	Massas esperadas resultantes de clivagem pela rMhSPase I (Da)
P97	2691,24	447,54 e 2243,70
P97-like	2907,44	341,37 e 2566,07
P216	2689,22	314,39 e 2374,83

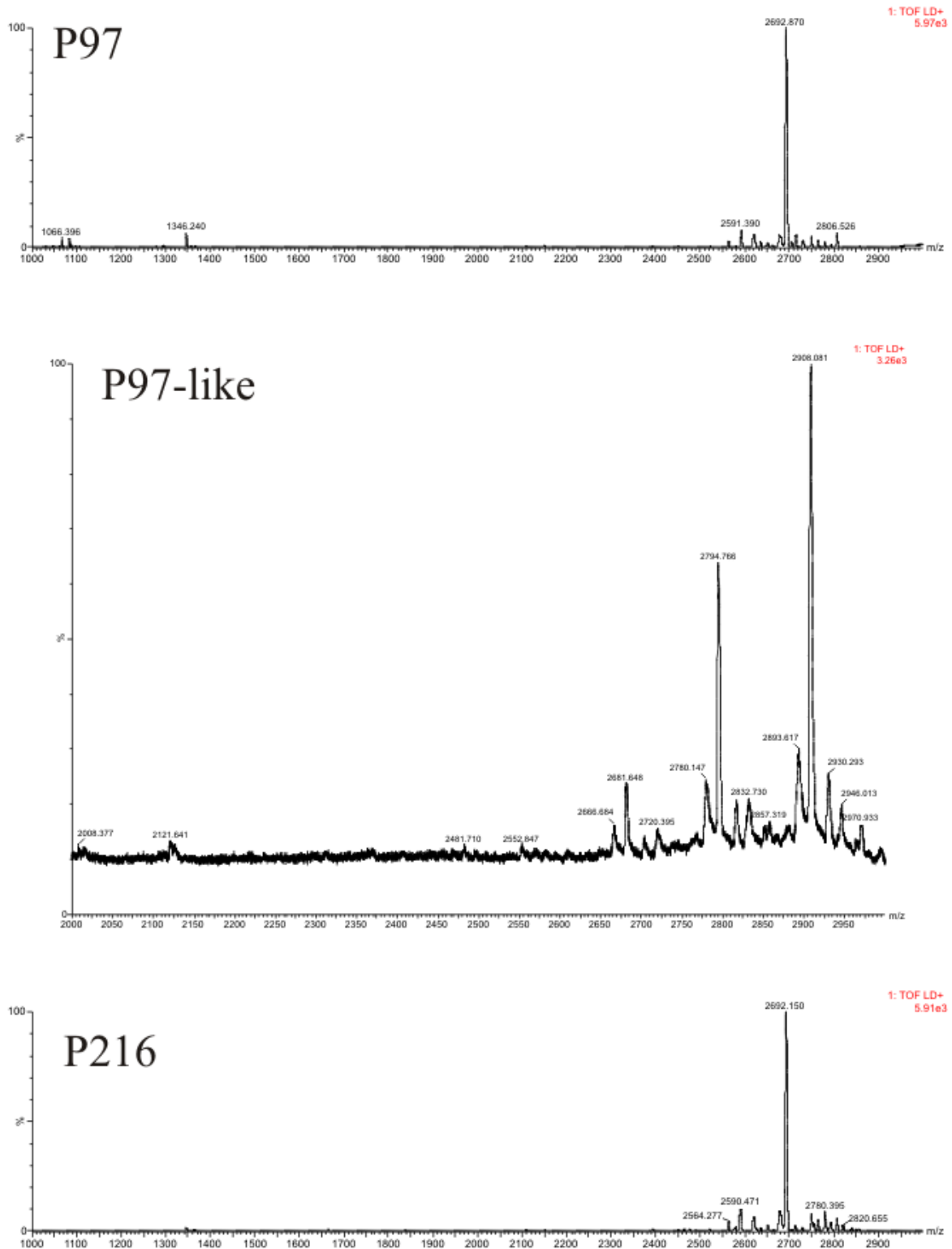


Figura 7. Espectros de massas correspondentes aos PSs sintéticos após os ensaios de clivagem *in vitro* com ou sem a presença da rMhSPase I nas diversas condições testadas. Os espectros correspondem aos peptídeos íntegros derivados da P97 (massa molecular: 2691,24 Da) e da P216 (massa molecular: 2689,22 Da). O peptídeo sintético correspondente à P97-like apresentou-se degradado (massa molecular do peptídeo íntegro: 2907,44 Da) mesmo sem a adição da rMhSPase I.

5. Discussão final

Os sequenciamentos dos genomas das linhagens de *M. hyopneumoniae* geraram estudos subsequentes de aspectos funcional e aplicado. Apesar de proteínas de membrana, como adesinas e lipoproteínas, terem sido alvos ou identificadas nesses estudos (Madsen *et al.*, 2008; Meens *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009; Wilton *et al.*, 2009), não existem comprovações experimentais sobre os mecanismos que estariam envolvidos na translocação e processamento proteolítico dessas proteínas. Também são raros os relatos sobre as proteínas exportadas pelo *M. hyopneumoniae* e como elas interagiriam com o hospedeiro, apesar da importância que essas proteínas possam ter na relação micoplasma-hospedeiro (Li *et al.*, 2009b). Com relação ao sistema de exportação e processamento de tais proteínas, os genomas de linhagens de *M. hyopneumoniae* revelaram a ausência ou não conservação de alguns componentes de sistemas de exportação (por exemplo, a proteína SecB e o RNA 4,5S) e até sistemas de exportações inteiros (sistema Tat). No entanto, a CDS relativa à SPase I foi conservada durante a evolução do *M. hyopneumoniae*, fato compartilhado somente com mais 4 das 14 espécies do gênero *Mycoplasma* cujos genomas foram totalmente sequenciados (Benson *et al.*, 2008). Este trabalho constitui a primeira caracterização de uma proteína relacionada ao sistema Sec de exportação de proteínas no *M. hyopneumoniae*, a SPase I.

A análise genômica à procura de PSs em proteínas preditas de serem secretadas pelo sistema Sec revelou que proteínas de membrana, adesinas, antígenos de superfície e proteínas hipotéticas seriam processadas pela SPase I. A frequência de aminoácidos observada nos sítios de clivagem por SPase I dos PSs de *M. hyopneumoniae* está de acordo com o observado em bactérias (Nielsen *et al.*, 1997). Além disso, o tamanho médio e moda

observados para os PSs de *M. hyopneumoniae* é mais próximo aos observados em bactérias gram-positivas do que em gram-negativas (Bendtsen *et al.*, 2004). É importante salientar que apesar de usar softwares com diferentes métodos para a predição dos PSs, não existem algoritmos ou características determinadas para os PSs de *Mollicutes*, o que implica num resultado tendencioso para os modelos já conhecidos: gram-negativos, gram-positivos e eucariotos. Apesar de uma possível negligência aos PSs característicos de *Mollicutes*, os resultados indicam que houve uma conservação da estrutura e sítio de clivagem dos PSs ao longo da evolução do *M. hyopneumoniae*. A aparente conservação dos PSs em *M. hyopneumoniae* contrasta com a ausência de conservação de genes correspondentes a componentes do sistema Sec observada para os genomas de *M. hyopneumoniae* e outros *Mollicutes* (Minion *et al.*, 2004; Westberg *et al.*, 2004; Catrein *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2005).

A indicação de adesinas já caracterizadas (P97, P97-like, P216 e P102) como possuidoras de PSs processados por SPase I permite associar o processamento destas adesinas à ação da SPase I. Antes de discutir o assunto detalhadamente, é importante salientar que este trabalho não conseguiu comprovar o processamento *in vitro* dos PSs sintéticos relativos às adesinas P97, P97-like e P216 com os métodos aplicados (discutido posteriormente), o que confere um aspecto hipotético, mas não indutivo a discussão acerca do processamento de adesinas pela MhSPase I.

A adesina P97 é uma das proteínas mais caracterizadas do *M. hyopneumoniae* (Hsu *et al.*, 1997; Djordjevic *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2009). Foi demonstrado que a adesina P97 passa por uma série de clivagens proteolíticas, sendo detectados peptídeos derivados, mas raramente a pré-proteína, em imunoblots de extrato protéico total de *M. hyopneumoniae* (Djordjevic *et al.*, 2004). O

complexo padrão de clivagem da pré-proteína também ocorre com as adesinas P102 (Djordjevic *et al.*, 2004), P159 (Burnett *et al.*, 2006) e P216 (Wilton *et al.*, 2009) e outros parálogos da P97 e P102 (Pinto *et al.*, 2007b). Os peptídeos derivados das adesinas podem ser encontrados na superfície celular, mesmo não possuindo porção transmembranar (Djordjevic *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2006). O processamento das adesinas é específico para cada pré-proteína, sendo até específico para cada linhagem de *M. hyopneumoniae* no caso de P97 e P159 (Djordjevic *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2006). Corroborando com a ideia de que este tipo de processamento proteolítico é específico de adesinas é a ausência destes processos em outras em outras proteínas de peso molecular alto (Pinto *et al.*, 2007b; Wilton *et al.*, 2009) e lipoproteínas bem caracterizadas (Kim *et al.*, 1990; Futo *et al.*, 1995).

Uma característica comum entre os processamentos proteolíticos das adesinas é que estes, ou parte destes, devem ocorrer durante ou logo após a translocação da proteína para a membrana (Djordjevic *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2006; Wilton *et al.*, 2009). No entanto, não foi determinada a(s) proteína(s) responsável por essas clivagens. Tendo os fatos citados, o processamento proteolítico das adesinas ou pelo menos parte do processamento destas pela MhSPase I torna-se bastante razoável. Como demonstrado pela análise *in silico* deste trabalho, as adesinas P97, P216 e P102 possuem PSs característicos de serem processados pela SPase I. Este fato implicaria na exportação destas adesinas via sistema Sec. O sistema Sec dispõe de duas endopeptidases que atuam durante ou logo após a translocação, SPase I e SPase II (Paetzel *et al.*, 2002). Como mencionado anteriormente, o processamento proteolítico em *M. hyopneumoniae* é característico de adesinas, mas não lipoproteínas. Logo, a SPase I seria a única endopeptidase conhecida que teria acesso às proteínas durante ou imediatamente após a sua translocação.

O fato do processamento proteolítico de adesinas variar de acordo com a linhagem de *M. hyopneumoniae*, onde as diferenças de sequências das adesinas não justificariam o processamento proteolítico diferencial (Djordjevic *et al.*, 2004), leva a indução de que diferentes linhagens teriam distintas capacidades de processamento de adesinas. Essa ideia é corroborada pela expressão diferencial entre três linhagens de *M. hyopneumoniae* de uma candidata ao processamento proteolítico das adesinas, a MhSPase I. Assim, seria possível supor que uma diferença quantitativa na capacidade de proteólise, ou mesmo de exportação das adesinas, poderia acarretar em uma diferença no padrão de clivagem de cada adesina. Ainda mais, a possível atuação da MhSPase I nas adesinas não impossibilitaria a ação subsequente de outras peptidases de membrana que atuariam sob outros modos de regulação.

Os estudos sobre o processamento proteolítico das adesinas compõem um cenário interessante em relação ao destino final de seus peptídeos derivados e respectivos peptídeos-sinal. O trabalho desenvolvido com a P216 não foi capaz de identificar a ponta amino-terminal do peptídeo P120 (porção amino-terminal resultante da clivagem da pré-proteína) que se localiza na membrana (Wilton *et al.*, 2009). Como não foram determinados os primeiros aminoácidos da porção amino-terminal do peptídeo P120, não é possível afirmar se a ausência do PS é devido à clivagem ou às limitações dos métodos empregados. Em relação à adesina P159, o PS não é removido do peptídeo P27 (porção amino-terminal resultante da clivagem da pré-proteína) na linhagem 232 (Burnett *et al.*, 2006), no entanto não foi possível determinar a localização celular dessa porção devido a problemas com os controles. Ao que se refere à adesina P97, o processamento proteolítico na linhagem J gera o peptídeo P22 (porção amino-terminal) cujo PS não é removido, mas na linhagem 232 esse peptídeo não foi encontrado (Djordjevic *et al.*, 2004), sendo sugerido subseqüentes clivagens dessa porção. Interessantemente, anticorpos contra o peptídeo P22 foram capazes de

localizar agregados na matriz extracelular, no citosol e na membrana da linhagem 232. Em conjunto, esses resultados não são capazes de afirmar ou negar a necessidade de remoção do PS para uma localização na superfície da membrana ou na matriz extracelular dos peptídeos derivados correspondentes às porções amino-terminais das adesinas.

Como não foi possível obter as linhagens de *E. coli* IT41 ou IT89 (Inada *et al.*, 1989) para comprovação da funcionalidade da MhSPase I em testes de complementação *in vivo*, foram propostos ensaios de clivagem de PS sintético *in vitro*. Para ser processado pela SPase I, um PS tem de ter a sua porção hidrofóbica preservada (Kall *et al.*, 2004). A SPase I de *E. coli* é capaz de clivar um peptídeo mínimo composto pelos aminoácidos -3 à +2, no entanto uma clivagem mais eficiente é obtida quando o PS é composto pelos aminoácidos -7 à +2 (Dev *et al.*, 1990). Assim, a preservação de conformações estruturais, como alfa-hélice, seria necessária para o reconhecimento e clivagem do PS pela SPase I de *E. coli*.

Parte dos PSs pertencentes às proteínas P97, P97-like e P216 foram sintetizados observando-se o limite da capacidade de síntese dos peptídeos e estrutura mínima necessária para o reconhecimento pela SPase I. Os ensaios de clivagem foram guiados pela literatura existente sobre a caracterização de outras SPases I com PSs sintéticos (Stein *et al.*, 2000; Sharkov & Cai, 2002; Kim *et al.*, 2008). As condições utilizadas nesses ensaios estão representadas na Tabela 2. Somente um dos ensaios utilizados como referência foi realizado com um peptídeo marcado, enquanto que a detecção da clivagem nos outros dois trabalhos foi feita por espectrometria de massas e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*). Como não havia certeza com relação ao sítio de clivagem dos PSs utilizados nos ensaios com rMhSPase I, preferiu-se sintetizar peptídeos não marcados, para terem seus sítios de clivagem confirmados. Uma vez

confirmados os sítios de clivagem por espectrometria; novos PSs seriam sintetizados, dessa vez marcados, o que facilitaria a caracterização enzimática da rMhSPase I.

Tabela 2. Condições usadas em ensaios de clivagem com SPase I recombinante e PSs sintéticos em outros trabalhos.

Autores	SPase I (μM)	PS sintético (μM)	pH	Tampão	Triton-X 100
Stein <i>et al.</i> (2000)	lepB (<i>E. coli</i>) $8.6 \cdot 10^{-3}$	$\text{Y}^{\text{NO}_2}\text{FSASALAKIK}^{\text{Abz-NH}_2}$ 20	8,1	Tris-HCl (50 mM)	1%
Sharkov & Cai (2002)	SpsB (<i>Staphylococcus aureus</i>) 17,5	vários (12 aminoácidos) 250	9	Tris-HCl (50 mM), NaCl (200 mM), MgCl ₂ (5 mM)	0,375%
Kim <i>et al.</i> (2008)	Mutantes de lepB 1,69	FSASALAKI 400	7,7	Fosfato de sódio (25mM)	-

Os ensaios de clivagem de PSs sintéticos pela rMhSPase I foram realizados em várias condições, incluindo condições similares a de ensaios para outras SPase I. No entanto, não foi verificada a atividade da rMhSPase I sobre os PSs sintéticos P97, P97-like e P216. Também não foi possível purificar a SPase I recombinante de *E. coli* (lepB) (dados não mostrados) em quantidades suficientes para ser utilizada como controle positivo nos ensaios de clivagem. A ausência de um controle positivo nos ensaios de clivagem, impossibilitou qualquer conclusão sobre a atividade proteolítica ou não da rMhSPase I sobre os peptídeos sintéticos. Além disso, os ensaios foram projetados somente para determinação do local de clivagem, sendo demasiados prolongados e laboriosos (um ensaio típico tem duração de 7-8 dias, que envolvem a purificação da proteína, tempo de incubação, purificação e detecção dos peptídeos por espectrometria de massas) para permitir uma padronização adequada. Outro fator limitante foi a quantidade de substratos testados (quantidade de cada peptídeo e limitado número de peptídeos sintéticos). No entanto, algumas especulações a cerca da ausência de clivagem da rMhSPase I sobre os peptídeos sintéticos podem ser feitas:

a) A rMhSPase I pode ter sido expressa em sua forma inativa. A maioria dos estudos sobre a caracterização de SPase I recombinante usa como método de purificação cromatografia de afinidade à cauda de histidina incluída na proteína recombinante (Klenotic *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Kavanaugh *et al.*, 2007). Neste trabalho foi utilizado a rMhSPase I fusionada a glutationa-S-transferase (GST), como estratégia de purificação por cromatografia de afinidade. Os métodos de lise celular e as condições de eluição utilizadas para SPase I, no entanto, estão de acordo com a literatura mencionada.

b) A baixa solubilidade dos PSs sintéticos, com dificuldade de solubilização em 100% de DMSO, pode ter sido a causa da ausência da atividade da rMhSPase I. Durante os ensaios realizados, geralmente era observada a formação de um pellet de aparência viscosa no fundo dos eppendorfs. A eventual insolubilidade dos PSs sintéticos em tampão de ensaio resultaria em uma separação física entre a enzima, em solução, e o peptídeo, precipitado. É importante salientar que a atividade de SPase I é dependente do meio hidrofóbico e da inclusão do substrato e da enzima em micelas para a formação do complexo substrato-enzima (Stein *et al.*, 2000). Para a solução desse problema, tentou-se realizar, sem sucesso, ensaios de clivagem com a porção insolúvel do extrato celular de *M. hyopneumoniae*.

c) Não puderam ser excluídas as possibilidades dos peptídeos não serem substratos da MhSPase I ou de aminoácidos essenciais para o devido reconhecimento da MhSPase I terem sido deixados de fora ao projetar os PSs sintéticos.

Apesar de limitada, pois não representa a complexidade da relação parasita-hospedeiro (Casadevall & Pirofski, 1999), a visão centrada no patógeno tem sido bastante utilizada para investigação da patogenicidade e fatores de virulência de diversos microrganismos (Smith, 1977; Falkow, 1997; Finlay & Falkow, 1997; Falkow, 2004). No caso de *M. hyopneumoniae*, essa visão tem tido particular importância diante do fato de que

há variabilidade da virulência entre diferentes linhagens isoladas de campo (Vicca *et al.*, 2003). A diferença na virulência entre linhagens pôde ser identificada em estudos comparativos do perfil protéico de linhagens não patogênica e patogênicas cultivadas *in vitro* (Li *et al.*, 2009a; Pinto *et al.*, 2009). Baseado nessa visão da capacidade de causar doença centrada no patógeno, o fato da MhSPase I ser mais expressa em uma linhagem patogênica (7442), em comparação a outra linhagem patogênica (7448) e uma linhagem não patogênica (J), é um indicativo de que a MhSPase I pode estar relacionada com a virulência do *M. hyopneumoniae*. Caso essa indicação corresponda com a realidade, seria lógico supor que a linhagem 7442 teria maior capacidade patogênica do que a linhagem 7448. Apesar de não existirem estudos comparando a virulência entre essas duas linhagens, Vasconcelos *et al.* (resultados não publicados, 2005) observaram que a linhagem 7448 não foi capaz de causar PES em todos os animais experimentalmente inoculados e apresentou baixa soroconversão em animais experimentalmente doentes, o que sugere uma baixa virulência desta linhagem.

A localização em operon de *sipS* com genes que codificam componentes da biossíntese do Asn-tRNA e Gln-tRNA (Raczniak *et al.*, 2001), não só ratifica a caracterização de MhSPase I como fator de virulência, mas também é interessante do ponto de vista da fisiologia do *M. hyopneumoniae*. A CDS *sipS* é transcrita juntamente com as CDS correspondentes a uma proteína hipotética (*MHP0030*) e às subunidades A (*gatA*), B (*gatB*) e C (*gatC*) da aspartil-tRNA/glutamil-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase. O fato de *gatA* ser super expressa em condição de infecção, juntamente com *secA* que codifica a proteína homônima componente do sistema Sec (Madsen *et al.*, 2008), é um indicativo da importância do sistema Sec e da consequente coexpressão de *sipS* em níveis similares ao de *gatA* nessa condição. Esta conformação em operon sugere uma regulação integrada de

componentes da biossíntese e exportação de proteínas. Como observado por Arraes *et al.* (2007), o *M. hyopneumoniae* não possui rotas de síntese de aminoácidos, apesar de possuir enzimas necessárias para a produção de todos os aminoacil-tRNA. Assim, num cenário de disponibilidade de aminoácidos, como durante a infecção, o *M. hyopneumoniae* coregularia a síntese e a exportação de proteínas que estariam em contato direto com o hospedeiro. Tal regulação conjunta conferiria ao *M. hyopneumoniae* uma vantagem metabólica e temporal nos primeiros momentos da colonização do epitélio do hospedeiro. Além disso, essa aparente integração entre diferentes rotas metabólicas pode estar subestimada, devendo ser considerados futuros estudos a respeito de outros processos regulatórios, como superoperons (Lathe *et al.*, 2000) e suboperons (Guell *et al.*, 2009).

Algumas características observadas da MhSPase I a indicam como um potencial antígeno diagnóstico. A MhSPase I possui sequência de aminoácidos de baixa identidade com ortólogos pertencentes a outros micoplasmas e bactérias relacionadas com o CDRS. Além disso, soro anti-rMhSPase I não possui reação cruzada com extratos de *M. flocculare* e *M. hyorhinis*. A MhSPase I se mostrou imunogênica para camundongos enquanto que a antigenicidade para suínos foi demonstrada por animais em condições de laboratório e campo. A comparação de resultados obtidos com ELISA-SPase I (ELISA cujo antígeno é a rMhSPase I) e ELISA-T mostrou razoável concordância, cujas diferenças podem ser explicadas pela baixa sensibilidade (Erlandson *et al.*, 2005) e possibilidade de falsos positivos observados para o ELISA-T (Bereiter *et al.*, 1990). Por se tratar de um antígeno recombinante, a rMhSPase I conferiria uma vantagem ao diminuir a possibilidade de reação cruzada e de falsos positivos no caso de seu possível uso em sorodiagnóstico. Outra vantagem apresentada pela rMhSPase I é a aparente maior sensibilidade em comparação ao

ELISA-T, fato que é corroborado pela alta imunogenicidade observada em camundongos imunizados com a rMhSPase I.

Mesmo apresentando um promissor desempenho com soro de animais de campo com suspeita de infecção por *M. hyopneumoniae*, o potencial diagnóstico do ELISA-SPase I deve ser confirmado por experimentos futuros. Para tanto, seriam necessárias condições controladas de infecção de suínos com *M. hyopneumoniae* e outras bactérias, incluindo micoplasmas. Parâmetros como soroconversão e reação cruzada deveriam ser verificados e confirmados por estes experimentos. Além disso, de alta relevância para o diagnóstico de infecção de *M. hyopneumoniae* é a possibilidade de distinguir animais infectados de animais vacinados, já que a vacinação é usada para controle da PES, mas não previne a colonização por *M. hyopneumoniae* (Maes *et al.*, 2008). Na avaliação preliminar das características imunológicas da MhSPase I, não foi possível verificar a capacidade de distinção entre soros de animais infectados ou vacinados com bacterinas comerciais. Outra etapa importante para a validação do uso comercial da rMhSPase I como antígeno diagnóstico é a otimização do método de purificação, que deve ser economicamente viável, aprimorando a pureza do antígeno recombinante. Essas medidas diminuiriam o custo de um possível kit, assim como o valor do cut-off e o *background* das reações.

De acordo com Chakravarti *et al.* (2000) os critérios básicos para um candidato a formulação de vacina são: conservação antigênica entre isolados clínicos, capacidade de indução da produção de anticorpos funcionais, comprovação de proteção em modelos animais; e, finalmente, a confirmação da eficácia e segurança para o uso final. Além disso, a localização na superfície do patógeno de uma proteína candidata a formulação vacinal é um fator desejável, pois esta estaria em primeiro contato com os componentes do sistema imunológico do hospedeiro. Como demonstrado, a MhSPase I é expressa pelas três

linhagens de *M. hyopneumoniae* estudadas, tendo possível localização de membrana, sendo antigênica e imunogênica. Assim, a MhSPase I apresenta as primeiras características de um possível alvo para o desenvolvimento de vacina contra *M. hyopneumoniae*. Para tanto, seu potencial protetor deve ser investigado em próximos experimentos.

6. Conclusões e perspectivas

Este trabalho demonstrou que a SPase I de *M. hyopneumoniae* é uma enzima que desperta grande interesse, tanto pelas suas implicações na fisiologia da bactéria como na suas possíveis aplicações biotecnológicas. A MhSPase I é expressa por todas as linhagens analisadas, estando relacionada com a virulência do *M. hyopneumoniae*. Além do possível envolvimento na exportação de proteínas para matriz extracelular, as predições de PSs indicaram que a MhSPase I estaria relacionada também com a exportação e processamento de adesinas. No entanto, não foi possível verificar essa atividade sobre os PSs sintéticos das adesinas P97, P97-like e P216 com a estratégia desenvolvida. Devido as suas características imunológicas até então estudadas, relação com a virulência e possíveis localização na membrana e papel na fisiologia do *M. hyopneumoniae*; a MhSPase I apresenta-se como um promissor alvo para o desenvolvimento de diagnóstico e vacina da PES. Estudos futuros devem focar as possíveis aplicações biotecnológicas da MhSPase I, além de elucidar o papel da MhSPase I na exportação de proteínas pela bactéria e esclarecer sua relação com o processamento proteolítico das adesinas. As perspectivas imediatas deste estudo são:

a) Verificar a atividade da MhSPase I em ensaios *in vitro* ou em testes de complementação *in vivo*, investigando sua preferência de substrato e a possível relação com o processamento proteolítico de adesinas.

b) Ampliar os experimentos com ELISA-SPase I visando à validação deste teste para uso diagnóstico.

c) Investigar o perfil da resposta imunológica em modelo murino contra rMhSPase I com o objetivo de elucidar o potencial vacinal da MhSPase I.

7. Referências bibliográficas (exceto Parte 1)

Abipecs. Relatório ABIPECS 2008. São Paulo, p.22. 2008

Adams, C.; Pitzer, J. & Minion, F. C. In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun*, 73(11): 7784-7, 2005.

Ameri-Mahabadi, M.; Zhou, E. M. & Hsu, W. H. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *J Vet Diagn Invest*, 17(1): 61-4, 2005.

Arraes, F. B. M.; Carvalho, M. J. A. D.; Maranhão, A. Q.; Brígido, M. M.; Pedrosa, F. O. & Felipe, M. S. S. Differential metabolism of *Mycoplasma* species as revealed by their genomes. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 182-189, 2007.

Asai, T.; Okada, M.; Ono, M.; Irisawa, T.; Mori, Y.; Yokomizo, Y. & Sato, S. Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol*, 38(3-4): 253-60, 1993.

Babu, M. M.; Priya, M. L.; Selvan, A. T.; Madera, M.; Gough, J.; Aravind, L. & Sankaran, K. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol*, 188(8): 2761-2773, 2006.

Barre, A.; De Daruvar, A. & Blanchard, A. MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of *Mollicutes*. *Nucleic Acids Res*, 32: D307-10, 2004.

Bendtsen, J. D.; Kiemer, L.; Fausboll, A. & Brunak, S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol*, 5: 58, 2005.

Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Von, H. G. & Brunak, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4): 783-795, 2004.

Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J. & Wheeler, D. L. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue): D25-30, 2008.

Bereiter, M.; Young, T. F.; Joo, H. S. & Ross, R. F. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet Microbiol*, 25(2-3): 177-92, 1990.

Blanchard, B.; Vena, M. M.; Cavalier, A.; Le Lannic, J.; Gouranton, J. & Kobisch, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*, 30(4): 329-41, 1992.

Bockstael, K.; Geukens, N.; Rao, C. V.; Herdewijn, P.; Anne, J. & Van Aerschot, A. An easy and fast method for the evaluation of *Staphylococcus epidermidis* type I signal peptidase inhibitors. *J Microbiol Methods*, 78(2): 231-7, 2009a.

- Bockstael, K.; Geukens, N.; Van Mellaert, L.; Herdewijn, P.; Anne, J. & Van Aerschot, A. Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated infections of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 155(Pt 11): 3719-29, 2009b.
- Bonnemain, C.; Raynaud, C.; Reglier-Poupet, H.; Dubail, I.; Frehel, C.; Lety, M. A.; Berche, P. & Charbit, A. Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 51(5): 1251-66, 2004.
- Brockmeier, S. L.; Halbur, P. G. & Thacker, E. L. Porcine Respiratory Disease Complex. In: Borgden, K. A. & Guthmiller, J. M. (Ed.). *Polymicrobial Diseases Involving Viruses and Bacteria*. Washington, DC: AMS, p.231–258, 2002.
- Burnett, T. A.; Dinkla, K.; Rohde, M.; Chhatwal, G. S.; Uphoff, C.; Srivastava, M.; Cordwell, S. J.; Geary, S.; Liao, X.; Minion, F. C.; Walker, M. J. & Djordjevic, S. P. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol*, 60(3): 669-86, 2006.
- Calus, D.; Maes, D.; Meyns, T.; Pasmans, F. & Haesebrouck, F. In vivo virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates does not correlate with in vitro adhesion assessed by a microtitre plate adherence assay. *J Appl Microbiol*, 106(6): 1951-6, 2009.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*, 67(8): 3703-13, 1999.
- Catrein, I.; Herrmann, R.; Bosserhoff, A. & Ruppert, T. Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase. *FEBS J*, 272(11): 2892-900, 2005.
- Caulfield, M. P.; Duong, L. T.; O'brien, R.; Majzoub, J. A. & Rosenblatt, M. A chemically synthesized radiolabeled signal peptide: design, preparation, and biological evaluation of an iodinated analog of preproparathyroid hormone. *Mol Endocrinol*, 2(5): 452-8, 1988.
- Chakravarti, D. N.; Fiske, M. J.; Fletcher, L. D. & Zagursky, R. J. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine*, 19(6): 601-12, 2000.
- Chatterjee, S.; Suci, D.; Dalbey, R. E.; Kahn, P. C. & Inouye, M. Determination of Km and kcat for signal peptidase I using a full length secretory precursor, pro-OmpA-nuclease A. *J Mol Biol*, 245(4): 311-314, 1995.
- Chen, A. Y.; Fry, S. R.; Forbes-Faulkner, J.; Daggard, G. & Mukkur, T. K. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J Med Microbiol*, 55(Pt 7): 923-929, 2006.
- Chen, Y. L.; Wang, S. N.; Yang, W. J.; Chen, Y. J.; Lin, H. H. & Shiuan, D. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun*, 71(3): 1155-1160, 2003.

- Chittick, W.; Holck, J. T.; Polson, D. D.; Luehrs, A. & Miller, S. Capabilities of two *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA serologic assays. In: Proceeding of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa, USAp.251, 2002.
- Dev, I. K.; Ray, P. H. & Novak, P. Minimum substrate sequence for signal peptidase I of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 265(33): 20069-72, 1990.
- Djordjevic, S. P.; Cordwell, S. J.; Djordjevic, M. A.; Wilton, J. & Minion, F. C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun*, 72(5): 2791-2802, 2004.
- Driessen, A. J. & Nouwen, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem*, 77: 643-67, 2008.
- Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5): 1792-7, 2004.
- Erlandson, K. R.; Evans, R. B. & Thacker, B. J. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*, 13(4): 198-203, 2005.
- Fadiel, A.; Eichenbaum, K. D.; El Semary, N. & Epperson, B. Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. *Front Biosci*, 12: 2020-8, 2007.
- Falkow, S. What is a pathogen? *ASM News*, 63: 359-365, 1997.
- Falkow, S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity--a personal recollection 15 years later. *Nat Rev Microbiol*, 2(1): 67-72, 2004.
- Farmery, M.; Macao, B.; Larsson, T. & Samuelsson, T. Binding of GTP and GDP induces a significant conformational change in the GTPase domain of Ffh, a bacterial homologue of the SRP 54 kDa subunit. *Biochim Biophys Acta*, 1385(1): 61-8, 1998.
- Fekkes, P. & Driessen, A. J. M. Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(1): 161-173, 1999.
- Feld, N. C.; Qvist, P.; Ahrens, P.; Friis, N. F. & Meyling, A. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*, 30(1): 35-46, 1992.
- Feng, Z. X.; Shao, G. Q.; Liu, M. J.; Wang, H. Y.; Gan, Y. & Wu, X. S. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol*, 2009.
- Ferreira, H. B. & Castro, L. A. D. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 245-255, 2007.
- Finlay, B. B. & Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(2): 136-69, 1997.
- Frank, K. & Sippl, M. J. High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics*, 24(19): 2172-2176, 2008.

Fraser, C. M.; Gocayne, J. D.; White, O.; Adams, M. D.; Clayton, R. A.; Fleischmann, R. D.; Bult, C. J.; Kerlavage, A. R.; Sutton, G.; Kelley, J. M.; Fritchman, R. D.; Weidman, J. F.; Small, K. V.; Sandusky, M.; Fuhrmann, J.; Nguyen, D.; Utterback, T. R.; Saudek, D. M.; Phillips, C. A.; Merrick, J. M.; Tomb, J. F.; Dougherty, B. A.; Bott, K. F.; Hu, P. C.; Lucier, T. S.; Peterson, S. N.; Smith, H. O.; Hutchison, C. A., 3rd & Venter, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270(5235): 397-403, 1995.

Friis, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med*, 27(6): 337-9, 1975.

Futo, S.; Seto, Y.; Okada, M.; Sato, S.; Suzuki, T.; Kawai, K.; Imada, Y. & Mori, Y. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 33(3): 680-683, 1995.

Gariani, T. & Sauer-Eriksson, E. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the signal recognition particle receptor FtsY from *Mycoplasma mycoides*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 8): 1030-2, 2000.

Gomi, M.; Sonoyama, M. & Mitaku, S. High performance system for signal peptide prediction: SOSUlsignal. *Chem-Bio Informatics Journal*, 4(4): 142-147, 2004.

Guell, M.; Van Noort, V.; Yus, E.; Chen, W. H.; Leigh-Bell, J.; Michalodimitrakis, K.; Yamada, T.; Arumugam, M.; Doerks, T.; Kuhner, S.; Rode, M.; Suyama, M.; Schmidt, S.; Gavin, A. C.; Bork, P. & Serrano, L. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science*, 326(5957): 1268-71, 2009.

Hege, R.; Zimmermann, W.; Scheidegger, R. & Stark, K. D. Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland--identification and quantification of risk factors. *Acta Vet Scand*, 43(3): 145-56, 2002.

Hiller, K.; Grote, A.; Scheer, M.; Munch, R. & Jahn, D. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue): W375-W379, 2004.

Hsu, T.; Artiushin, S. & Minion, F. C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol*, 179(4): 1317-23, 1997.

Inada, T.; Court, D. L.; Ito, K. & Nakamura, Y. Conditionally lethal amber mutations in the leader peptidase gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 171(1): 585-587, 1989.

Jacques, M.; Blanchard, B.; Foiry, B.; Girard, C. & Kobisch, M. In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Ann Rech Vet*, 23(3): 239-47, 1992.

Jenkins, C.; Wilton, J. L.; Minion, F. C.; Falconer, L.; Walker, M. J. & Djordjevic, S. P. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun*, 74(1): 481-7, 2006.

Jensen, C. S.; Ersboll, A. K. & Nielsen, J. P. A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Prev Vet Med*, 54(3): 265-78, 2002.

Juncker, A. S.; Willenbrock, H.; Von Heijne, G.; Brunak, S.; Nielsen, H. & Krogh, A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*, 12(8): 1652-62, 2003.

Kall, L.; Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 338(5): 1027-1036, 2004.

Kanehisa, M.; Goto, S.; Furumichi, M.; Tanabe, M. & Hirakawa, M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue): D355-60, 2010.

Karla, A.; Lively, M. O.; Paetzel, M. & Dalbey, R. The identification of residues that control signal peptidase cleavage fidelity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 280(8): 6731-41, 2005.

Kavanaugh, J. S.; Thoendel, M. & Horswill, A. R. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol*, 65(3): 780-798, 2007.

Kim, M. F.; Heidari, M. B.; Stull, S. J.; Mcintosh, M. A. & Wise, K. S. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect Immun*, 58(8): 2637-43, 1990.

Kim, Y.-T.; Yoshida, H.; Kojima, M.; Kurita, R.; Nishii, W.; Muramatsu, T.; Ito, H.; Park, S. J. & Takahashi, K. The Effects of Mutations in the Carboxyl-Terminal Region on the Catalytic Activity of *Escherichia coli* Signal Peptidase I. *J Biochem*, 143(2): 237-242, 2008.

Klenotic, P. A.; Carlos, J. L.; Samuelson, J. C.; Schuenemann, T. A.; Tschantz, W. R.; Paetzel, M.; Strynadka, N. C. & Dalbey, R. E. The role of the conserved box E residues in the active site of the *Escherichia coli* type I signal peptidase. *J Biol Chem*, 275(9): 6490-6498, 2000.

Kobisch, M.; Tillon, J.; Vannier, P.; Magneur, S. & Morvan, P. Pneumonie enzootique à *Mycoplasma suis pneumoniae* chez le porc: diagnostic rapide et recherches d'anticorps. *Rec Méd Vét*, 154: 847-852, 1978.

Lammertyn, E.; Van, M. L.; Meyen, E.; Lebeau, I.; De, B. E.; Anne, J. & Geukens, N. Molecular and functional characterization of type I signal peptidase from *Legionella pneumophila*. *Microbiology*, 150(Pt 5): 1475-1483, 2004.

Lathe, W. C., 3rd; Snel, B. & Bork, P. Gene context conservation of a higher order than operons. *Trends Biochem Sci*, 25(10): 474-9, 2000.

Le Grand, A. & Kobisch, M. Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res*, 27(3): 241-53, 1996.

Lee, P. A.; Tullman-Ercek, D. & Georgiou, G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol*, 60: 373-95, 2006.

Li, Y. Z.; Ho, Y. P.; Chen, S. T.; Chiou, T. W.; Li, Z. S. & Shiuan, D. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Mosc)*, 74(2): 215-20, 2009a.

- Li, Y. Z.; Ho, Y. P.; Chen, S. T. & Shiuan, D. Proteomic Analysis of the Interactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Tracheal Ciliated Cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009b.
- Luirink, J. & Sinning, I. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3): 17-35, 2004.
- Luirink, J.; Von Heijne, G.; Houben, E. & De Gier, J. W. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 59: 329-55, 2005.
- Macao, B.; Luirink, J. & Samuelsson, T. Ffh and FtsY in a *Mycoplasma mycoides* signal-recognition particle pathway: SRP RNA and M domain of Ffh are not required for stimulation of GTPase activity in vitro. *Mol Microbiol*, 24(3): 523-34, 1997.
- Machado, C. X.; Pinto, P. M.; Zaha, A. & Ferreira, H. B. A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H₂O₂ detoxification. *Microbiology*, 155(Pt 10): 3411-9, 2009.
- Madsen, M. L.; Nettleton, D.; Thacker, E. L. & Minion, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology*, 152(Pt 4): 937-44, 2006.
- Madsen, M. L.; Puttamreddy, S.; Thacker, E. L.; Carruthers, M. D. & Minion, F. C. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect Immun*, 76(2): 658-663, 2008.
- Maes, D.; Segales, J.; Meyns, T.; Sibila, M.; Pieters, M. & Haesebrouck, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*, 126(4): 297-309, 2008.
- Maes, D.; Verdonck, M.; Deluyker, H. & De Kruif, A. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q*, 18(3): 104-9, 1996.
- Meens, J.; Bolotin, V.; Frank, R.; Bohmer, J. & Gerlach, G. F. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet Microbiol*, 2009.
- Messier, S.; Ross, R. F. & Paul, P. S. Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res*, 51(1): 52-8, 1990.
- Meyns, T.; Dewulf, J.; De Kruif, A.; Calus, D.; Haesebrouck, F. & Maes, D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*, 24(49-50): 7081-6, 2006.
- Minion, F. C.; Lefkowitz, E. J.; Madsen, M. L.; Cleary, B. J.; Swartzell, S. M. & Mahairas, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol*, 186(21): 7123-7133, 2004.
- Muneta, Y.; Minagawa, Y.; Shimoji, Y.; Ogawa, Y.; Hikono, H. & Mori, Y. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Vet Med Sci*, 70(10): 1065-70, 2008.
- Natale, P.; Bruser, T. & Driessen, A. J. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1778(9): 1735-56, 2008.

Nicholas, K. B. & Nicholas, H. B. J. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments: Distribuído pelos autores p. 1997.

Nicolet, J.; Paroz, P. & Bruggmann, S. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci*, 29(3): 305-9, 1980.

Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S. & Von Heijne, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 10(1): 1-6, 1997.

Nishiyama, K.; Mizushima, S. & Tokuda, H. A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J*, 12(9): 3409-15, 1993.

Okamba, F. R.; Moreau, E.; Cheikh Saad, B. K.; Gagnon, C. A.; Massie, B. & Arella, M. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clin Vaccine Immunol*, 14(6): 767-774, 2007.

Osborne, A. R.; Rapoport, T. A. & Van Den Berg, B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21: 529-50, 2005.

Paetzel, M.; Dalbey, R. E. & Strynadka, N. C. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. *Pharmacol Ther*, 87(1): 27-49, 2000.

Paetzel, M.; Karla, A.; Strynadka, N. C. & Dalbey, R. E. Signal peptidases. *Chem Rev*, 102(12): 4549-4580, 2002.

Peng, S. B.; Wang, L.; Moomaw, J.; Peery, R. B.; Sun, P. M.; Johnson, R. B.; Lu, J.; Treadway, P.; Skatrud, P. L. & Wang, Q. M. Biochemical characterization of signal peptidase I from gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 183(2): 621-627, 2001.

Perlman, D. & Halvorson, H. O. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol*, 167(2): 391-409, 1983.

Pieters, M.; Pijoan, C.; Fano, E. & Dee, S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet Microbiol*, 134(3-4): 261-6, 2009.

Pinto, P. M.; Carvalho, M. O. D.; Alves-Junior, L.; Brocchi, M. & Schrank, I. S. Molecular analysis of an integrative conjugative element, ICEH, present in the chromosome of different strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 256-263, 2007a.

Pinto, P. M.; Chemale, G.; De Castro, L. A.; Costa, A. P.; Kich, J. D.; Vainstein, M. H.; Zaha, A. & Ferreira, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol*, 121(1-2): 83-93, 2007b.

Pinto, P. M.; Klein, C. S.; Zaha, A. & Ferreira, H. B. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci*, 7(1): 45, 2009.

Plewczynski, D.; Slabinski, L.; Ginalski, K. & Rychlewski, L. Prediction of signal peptides in protein sequences by neural networks. *Acta Biochim Pol*, 55(2): 261-267, 2008.

Racznik, G.; Becker, H. D.; Min, B. & Sälli, D. A Single Amidotransferase Forms Asparaginyl-tRNA and Glutaminyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49): 45862-45867, 2001.

Rafati, S.; Ghaemimanesh, F. & Zahedifard, F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine*, 24(16): 3290-7, 2006.

Razin, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: Maniloff, J.; Mcelhane, R. N.; Finch, L. R. & Baseman, J. B. (Ed.). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p.3-22, 1992.

Roberts, T. C.; Smith, P. A.; Cirz, R. T. & Romesberg, F. E. Structural and initial biological analysis of synthetic arylomycin A2. *J Am Chem Soc*, 129(51): 15830-8, 2007.

Rodriguez, F.; Ramirez, G. A.; Sarradell, J.; Andrada, M. & Lorenzo, H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol*, 130(4): 306-12, 2004.

Rusch, S. L. & Kendall, D. A. Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry*, 46(34): 9665-73, 2007.

Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 27(2): 157-62, 1967.

Serek, J.; Bauer-Manz, G.; Struhalla, G.; Van Den Berg, L.; Kiefer, D.; Dalbey, R. & Kuhn, A. *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J*, 23(2): 294-301, 2004.

Sharkov, N. A. & Cai, D. Discovery of substrate for type I signal peptidase SpsB from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 277(8): 5796-803, 2002.

Sibila, M.; Calsamiglia, M.; Segales, J. & Rosell, C. Association between *Mycoplasma hyopneumoniae* at different respiratory sites and presence of histopathological lung lesions. *Vet Rec*, 155(2): 57-8, 2004.

Sibila, M.; Pieters, M.; Molitor, T.; Maes, D.; Haesebrouck, F. & Segales, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J*, 181(3): 221-31, 2009.

Silva, A.; Paganini, F.; Acosta, J.; Rocha, P.; Mistura, H.; Marcon, E.; Simon, V. & Casagrande, H. Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I - Estudo do perfil das doenças respiratórias nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil. In: Anais X ABRAVES, Porto Alegre, 2001.

Sirand-Pugnet, P.; Citti, C.; Barre, A. & Blanchard, A. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res Microbiol*, 158(10): 754-66, 2007.

Smith, H. Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol Rev*, 41(2): 475-500, 1977.

Sorensen, V.; Ahrens, P.; Barfod, K.; Feenstra, A. A.; Feld, N. C.; Friis, N. F.; Bille-Hansen, V.; Jensen, N. E. & Pedersen, M. W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet Microbiol*, 54(1): 23-34, 1997.

Stein, R. L.; Barbosa, M. D. & Bruckner, R. Kinetic and mechanistic studies of signal peptidase I from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 39(27): 7973-83, 2000.

Sung, M. & Dalbey, R. E. Identification of potential active-site residues in the *Escherichia coli* leader peptidase. *J Biol Chem*, 267(19): 13154-9, 1992.

Tajima, M. & Yagihashi, T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun*, 37(3): 1162-9, 1982.

Thacker, E. L.; Thacker, B. J.; Boettcher, T. B. & Jayappa, H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J Swine Health Prod*, 6: 107-112, 1998.

Tjalsma, H.; Stover, A. G.; Driks, A.; Venema, G.; Bron, S. & Van Dijk, J. M. Conserved serine and histidine residues are critical for activity of the ER-type signal peptidase SipW of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 275(33): 25102-8, 2000.

Tomkiewicz, D.; Nouwen, N. & Driessen, A. J. Pushing, pulling and trapping--modes of motor protein supported protein translocation. *FEBS Lett*, 581(15): 2820-8, 2007.

Van Dijk, J. M.; De Jong, A.; Vehmaanpera, J.; Venema, G. & Bron, S. Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J*, 11(8): 2819-28, 1992.

Van Roosmalen, M. L.; Geukens, N.; Jongbloed, J. D.; Tjalsma, H.; Dubois, J. Y.; Bron, S.; Van Dijk, J. M. & Anne, J. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1694(1-3): 279-297, 2004.

Vasconcelos, A. T.; Ferreira, H. B.; Bizarro, C. V.; Bonatto, S. L.; Carvalho, M. O.; Pinto, P. M.; Almeida, D. F.; Almeida, L. G.; Almeida, R.; Ves-Filho, L.; Assuncao, E. N.; Azevedo, V. A.; Bogo, M. R.; Brigido, M. M.; Brocchi, M.; Burity, H. A.; Camargo, A. A.; Camargo, S. S.; Carepo, M. S.; Carraro, D. M.; De Mattos Cascardo, J. C.; Castro, L. A.; Cavalcanti, G.; Chemale, G.; Collevatti, R. G.; Cunha, C. W.; Dallagiovanna, B.; Dambros, B. P.; Dellagostin, O. A.; Falcao, C.; Fantinatti-Garboggini, F.; Felipe, M. S.; Fiorentin, L.; Franco, G. R.; Freitas, N. S.; Frias, D.; Grangeiro, T. B.; Grisard, E. C.; Guimaraes, C. T.; Hungria, M.; Jardim, S. N.; Krieger, M. A.; Laurino, J. P.; Lima, L. F.; Lopes, M. I.; Loreto, E. L.; Madeira, H. M.; Manfio, G. P.; Maranhao, A. Q.; Martinkovics, C. T.; Medeiros, S. R.; Moreira, M. A.; Neiva, M.; Ramalho-Neto, C. E.; Nicolas, M. F.; Oliveira, S. C.; Paixao, R. F.; Pedrosa, F. O.; Pena, S. D.; Pereira, M.; Pereira-Ferrari, L.; Piffer, I.; Pinto, L. S.; Potrich, D. P.; Salim, A. C.; Santos, F. R.; Schmitt, R.; Schneider, M. P.; Schrank, A.; Schrank, I. S.; Schuck, A. F.; Seuanes, H. N.; Silva, D. W.; Silva, R.; Silva, S. C.; Soares, C. M.; Souza, K. R.; Souza, R. C.; Staats, C. C.; Steffens, M. B.; Teixeira, S. M.; Urmenyi, T. P.; Vainstein, M. H.; Zuccherato, L. W.; Simpson, A. J. & Zaha, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol*, 187(16): 5568-5577, 2005.

Vicca, J.; Stakenborg, T.; Maes, D.; Butaye, P.; Peeters, J.; De Kruif, A. & Haesebrouck, F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol*, 97(3-4): 177-90, 2003.

Von Heijne, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem*, 133(1): 17-21, 1983.

Von Heijne, G. The signal peptide. *J Membr Biol*, 115(3): 195-201, 1990.

Westberg, J.; Persson, A.; Holmberg, A.; Goesmann, A.; Lundeberg, J.; Johansson, K. E.; Pettersson, B. & Uhlen, M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res*, 14(2): 221-7, 2004.

Wilton, J.; Jenkins, C.; Cordwell, S. J.; Falconer, L.; Minion, F. C.; Oneal, D. C.; Djordjevic, M. A.; Connolly, A.; Barchia, I.; Walker, M. J. & Djordjevic, S. P. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol*, 71(3): 566-82, 2009.

Yus, E.; Maier, T.; Michalodimitrakis, K.; Van Noort, V.; Yamada, T.; Chen, W. H.; Wodke, J. A.; 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. & Serrano, L. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science*, 326(5957): 1263-8, 2009.

Zielinski, G. C. & Ross, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am J Vet Res*, 54(8): 1262-9, 1993.

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

Dados pessoais

Nome Lucas Moitinho e Silva
Nome em citações bibliográficas Moitinho-Silva, L.; Silva, L.M.
Sexo Masculino
Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.
Av. Bento Gonçalves, 9500
Agronomia
91509-900 - Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: (51) 33087769

E-mail lmoitinho@hotmail.com

Formação acadêmica/Titulação

2008-2010 **Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular** (Conceito CAPES 6).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.
Bolsista do: CNPq .

2003 - 2006 **Graduação em Biomedicina.**
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
Título: Análise da produção das citocinas IL-10 e IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico de pacientes chagásicos estimuladas pelos antígenos recombinantes CRA e FRA.
Orientadora: Yara de Miranda Gomes
Bolsista do: CNPq.

Formação complementar

2006 - 2006	Extensão universitária em Fundamentos da Geoquímica. do Petróleo com Aplicações industriais e ambientais: Compostos Recalcitrantes e Biorremediação. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
2006 - 2006	Extensão universitária em Genes, Genomas e Tecnologias Genômicas. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
2006 - 2006	Extensão universitária em Produção de Enzimas de Interesse Biotecnológico. (Carga horária: 80h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
2006 - 2006	Extensão universitária em Microrganismos Endofíticos e Biologia Molecular. (Carga horária: 80h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
2005 - 2005	Sensibilização e Informação em Biossegurança (2º). (Carga horária: 12h). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.
2003 - 2003	I Curso de Radiofarmácia. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
2003 - 2003	Marcadores Genéticos e Epidemiologia Molecular. (Carga horária: 6h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
2003 - 2003	Radio e Foto-biologia. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Idiomas

Inglês	Compreende bem, fala bem, lê bem, escreve bem.
Francês	Compreende razoavelmente, fala razoavelmente, lê razoavelmente, escreve pouco.

Estágios

- Estágio voluntário
Jul 2007
Out 2007
- Biologia molecular.** “Cloning and characterization of xylanase gene from boiling mud”. *University of Mahidol*. Institute of Molecular Biology & Genetics, Tailândia.
Orientação: Kusol Pootanakit
- Estágio voluntário
Maio 2006
- Biologia Molecular.** “Caracterização molecular e *fingerprinting* de variedades de banana” *Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura – Embrapa*. Laboratório de Virologia e Biologia Molecular.
Orientação: Cláudia Fortes Ferreira
- Bolsista IC
CNPq
Nov 2004
Fev 2006
- Imunologia celular.** “Análise da produção das citocinas IL-10 e INF- γ por células mononucleares do sangue periférico de pacientes chagásicos estimuladas pelos antígenos recombinantes CRA e FRA”. *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz*. Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia.
Orientação: Yara de Miranda Gomes
- Estágio voluntário
Fev 2004
Jul 2004
- Radiofarmácia.** “Influência do fitoterápico ‘Mulher ativa’ na atividade hemolítica e marcação *in vitro* de eritrócitos e proteínas plasmáticas”. *Universidade Federal de Pernambuco*. Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Biofísica e Radiobiologia.
Orientação: Maria Teresa J. de Almeida Catanho

Artigos completos publicados em periódicos

1. LORENA, VIRGINIA M.B.; VERÇOSA, ALINNE F.A.; MACHADO, RAQUEL C.A.; SILVA, L. M.; CAVALCANTI, MARIA G.A.; SILVA, EDIMILSON D.; FERREIRA, ANTONIO G.P.; CORREA-OLIVEIRA, RODRIGO; PEREIRA, VALÉRIA R.A.; GOMES, YARA M.. Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* , v. 22, p. 91-98, 2008.

1. **MOITINHO-SILVA, LUCAS; HEINECK, BL; ZAHA, A; FERREIRA, HB** . Signal peptidase I of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a virulence factor as a potential diagnostic antigen. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009, Porto Alegre. XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.
2. **MOITINHO-SILVA, LUCAS; HEINECK, BL; ZAHA, A; FERREIRA, HB**. Cloning and Characterization of Signal Peptidases Type I and II of *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Águas de Lindóia. XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009.
3. **MOITINHO-SILVA, LUCAS; HEINECK, BL; ZAHA, A ; FERREIRA, HB** . Clonagem e caracterização das sinal-peptidases de tipo I e II de *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008, Porto Alegre. X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008.
4. **SILVA, L. M.; BOONYAPAKRON, K.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L**. Identification of Xylanase Genes from a boiling mud pool. In: The 19th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology "TSB 2007: Biotechnology for Gross National Happiness", 2007, Bangkok. The 19th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology "TSB 2007: Biotechnology for Gross National Happiness", 2007. p. 78-78.
5. **LORENA, VIRGINIA MARIA BARROS DE; VERÇOSA, ALINNE FERNANDA DE AMARAL ; MELO, MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS ; SILVA, L. M. ; CARVALHO, C. L. ; M, T. M. ; SILVA, E. D. ; SOUZA, W. V; FERREIRA, A. G. P.; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO ALVES ; GOMES, YARA DE MIRANDA**. Evaluation of immune cellular and humoral response from chagasic patients with cytoplasmatic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. In: XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 2006, Búzios. XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 2006.
6. **SILVA, L. M; LORENA, VIRGINIA MARIA BARROS DE; MACHADO, RAQUEL CORREA DE ASSIS; VERÇOSA, ALINNE FERNANDA DE AMARAL; MELO, MYLLENA DE FÁTIMA ALHEIROS DIAS ; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO ALVES ; LIRA, RODRIGO ALVES DE ; GOMES, YARA DE MIRANDA** . Resposta Linfoproliferativa de indivíduos chagásicos aos antígenos recombinantes CRA ou FRA de *Trypanosoma cruzi*. In: I Congresso Regional de Microbiologia Clínica, 2005, João Pessoa.

7. **SILVA, L. M.**; LORENA, VIRGINIA MARIA BARROS DE; VERÇOSA, ALINNE FERNANDA DE AMARAL; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO ALVE; GOMES, YARA DE MIRANDA. Padronização da resposta proliferativa de PBMC estimuladas com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*. In: Reunião anual de iniciação científica do CPqAM, 2005, Recife. Anais da Reunião anual de iniciação científica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2005. p. 22-22.

8. LORENA, VIRGINIA MARIA BARROS DE; VERÇOSA, ALINNE FERNANDA DE AMARAL; **SILVA, L. M.**; MACHADO, RAQUEL CORREA DE ASSIS; NAKASAWA, M.; KRIEGER, M. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOLDENBERG, S.; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO ALVES; GOMES, YARA DE MIRANDA. Perfil de citocinas produzidas por pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. In: XXI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses, 2005, Uberaba-MG. XXI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses, 2005.

9. **SILVA, L. M.**; SOUZA, G. M. L.; SILVA, J. O. ; BRANDAO, J. O. C.; CORREA, M. B. L.; MAGNATA, S. S. L. P.; SILVEIRA, M. DE F. G. DA PESSOA REIS, A. T. ; CARVALHO, E. B; CATANHO, M. T. J. A. Avaliação da ação do produto mulher ativa sobre a atividade hemolítica e marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio-99m *in vitro*. In: XIX - Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, 2004, Águas de Lindóia. FeSBE, 2004.