



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**CAROLINA PEREIRA TAVARES**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE**  
*Mycoplasma hyopneumoniae* E *Mycoplasma synoviae*.

**FLORIANÓPOLIS**

**2010**

**CAROLINA PEREIRA TAVARES**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE**  
*Mycoplasma hyopneumoniae* E *Mycoplasma synoviae*.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**ORIENTADOR: PROF. Dr. HERNÁN TERENZI**

**CO-ORIENTADOR: Dr. JAVIER VERNAL**

**FLORIANÓPOLIS**

**2010**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Hernán Terenzi por um dia ter me dado a oportunidade de entrar para um excelente grupo de pesquisa e tão acolhedor, mas principalmente pelos conhecimentos compartilhados durante estes últimos cinco anos. Obrigada pelos esforços para nos fornecer tudo o necessário para que nosso trabalho seja possível de ser feito, eficiente e de qualidade.

Ao meu co-orientador Javier Vernal, que me recebeu da melhor maneira possível desde meu primeiro dia no laboratório. Muito obrigada pela paciência e por todo o conhecimento que compartilhastes comigo, o que fez minha jornada científica se tornar mais significativa, meu aprendizado mais rápido e meus resultados mais eficientes. Ao amigo Javier que tornou tudo isso tão mais divertido e obrigada por todos os chocolates e filmes compartilhados nestes cinco anos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica que trabalharam para que o programa se concretizasse e nossa primeira turma chegasse até aqui.

Aos colegas de laboratório, amigos, parceiros e confidentes Camila, Franciele, Gabi, Gabriele, Jean, Manuel, Priscila e Tiago pelas idéias trocadas, dúvidas sanadas e diversão garantida. Meus dias de trabalho pareceram mais curtos e mais leves junto de vocês.

À amiga e companheira Angela que em dois anos foi a quem recorri nos momentos de dúvida, preocupação e cansaço. Obrigada por compartilhar comigo os bons e maus momentos e nossas infundáveis conversas sobre nossos projetos de mestrado e de vida. Obrigado por ter

sido uma companheira de lamentações, de viagens, de idas ao laboratório aos fins de semana e por compartilhar tantos tubos comigo. Os resultados não seriam os mesmos se não tivéssemos trabalhado juntas.

Ao eterno companheiro e namorado que está ao meu lado há oito anos e partilhou comigo todas as minhas fases pessoais e profissionais, decisões, meus poucos fracassos e muitas vitórias. Obrigada por SEMPRE me incentivar a seguir em frente e ter palavras doces quando eu imagino que algo conspira contra mim. Foi com você que aprendi o verdadeiro significado das qualidades de companheirismo, otimismo, respeito e paciência. Obrigada por entender e respeitar meus inevitáveis momentos de ausência para que este projeto se concretizasse. Ter você ao meu lado me fez entender que a vida só é completa quando se é amada e quando se ama de verdade.

Aos meus pais Avani e Luiz Holly por terem me proporcionado o tão precioso dom da vida e por terem me dado a oportunidade de crescer em um lar que sempre incentivou auto-suficiência, aperfeiçoamento pessoal e intelectual. Todas as oportunidades de estudos de excelência me foram dadas e por isso cheguei até aqui. Obrigada pelos princípios ensinados, incentivo, apoio e amor incondicional. Obrigada mãe por me ensinar a compartilhar e obrigada pai, mesmo que ausente fisicamente, por ser parte de cada fase destas conquistas.

À minha família, aos irmãos Fernando, Alexandre, Andréia e Felipe, aos cunhados Giovani, Jennifer, Carlos e Janese, aos sobrinhos Vinícius, Eric, Sara e Orden, aos sogros Beto e Beti que, mesmo sem saber, me trouxeram a felicidade, amor e segurança necessários para que

minha jornada de trabalho fosse menos árdua. Vocês foram sempre fundamentais em todas as fases da minha vida.

À Deus só tenho a agradecer por TUDO que tenho, por sua paciência e por ter colocado todas estas pessoas junto de mim.

“O que faz andar o barco não é a vela enfunada,  
mas o vento que não se vê.” (Platão)

TAVARES, C.P. ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E *Mycoplasma synoviae*.2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

As espécies *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma synoviae* causam pneumonia em porcos e sinovite em frangos e perus, respectivamente, e em decorrência à perda de peso dos animais e susceptibilidade a infecções secundárias, essas bactérias têm causado prejuízos à suinocultura e avicultura catarinenses. Assim, o objetivo principal deste projeto foi submeter à análise proteômica amostras bacterianas ricas em proteínas de membrana, para identificação das mesmas por espectrometria de massa e construção de mapas proteômicos para as duas espécies. A identificação e caracterização de proteínas de membrana mostram-se úteis, já que essas proteínas estão envolvidas em funções celulares essenciais como transdução de sinais, osmoregulação, metabolismo e interação com hospedeiro. Os dados obtidos servirão de base para a identificação de possíveis alvos para fármacos, anticorpos monoclonais e também no auxílio em diagnósticos. Foram analisados no total, seis géis bidimensionais para cada espécie de *Mycoplasma* na faixa de pH 3-10, tendo duplicatas para os três detergentes utilizados: ASB14, CHAPS e SB3-10. Em relação à

resolução em número de spots e número de identificações, o detergente ASB14, mostrou-se mais eficiente para *M. hyopneumoniae* e no total foram identificadas por espectrometria de massas 24 proteínas de membrana (10 proteínas distintas). Para *M. synoviae* o detergente mais eficiente foi CHAPS e foram identificadas por espectrometria de massas 36 proteínas de membrana (10 proteínas distintas).

Palavras-chave: Proteômica; Proteínas de membrana; Mycoplasma.

TAVARES, C.P. ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E *Mycoplasma synoviae*.2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

### ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae* are causative agents of pneumonia in pigs and synovitis in chickens and turkeys, respectively. Due to the loss of animal weight and susceptibility to secondary infections, these bacteria have caused damage to pigs and poultry in Santa Catarina. Thus, the main objective of this project was to perform proteomic analysis of samples rich in bacterial membrane proteins, in order to identify them by mass spectrometry and to build proteomics maps for both species. The identification and characterization of membrane proteins is useful, since these proteins are involved in essential cellular functions such as signal transduction, osmoregulation, metabolism and interaction with host. The results obtained will help the identification of possible targets for drugs, monoclonal antibodies, and also in diagnosis. We analyzed a total of six two-dimensional gels for each species of mycoplasma in the pH range 3-10, with duplicates for the three detergents used: ASB14, CHAPS and SB3-10. Regarding gel resolution by the number of spots and the

number of identifications, the detergent ASB14 was more efficient for *M. hyopneumoniae* and a total of 24 membrane proteins were identified by mass spectrometry (10 different proteins). For *M. synoviae* the detergent CHAPS was most effective and there were identified 36 membrane proteins by mass spectrometry (10 different proteins).

Keywords: Proteomic; Membrane proteins; Mycoplasma.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** - Estrutura química do detergente zwitteriônico CHAPS.....8
- Figura 2** - Estrutura química do detergente zwitteriônico ASB-14.....8
- Figura 3** - Estrutura química do detergente zwitteriônico SB3-10.....8
- Figura 4** - Classificação funcional COG das proteínas identificadas de *M.hypopneumoniae*.....17
- Figura 5**- Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente CHAPS de *M. hypopneumoniae* corado com Coomassie Blue G250.....18
- Figura 6A**- Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente ASB-14 de *M. hypopneumoniae* corado com Coomassie Blue G250..... 19
- Figura 6B**- Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente ASB-14 de *M. hypopneumoniae* corado

com	Coomassie	Blue
G250.....		20

**Figura 7-** Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente SB3-10 de *M. hyopneumoniae* corado

com	Coomassie	Blue
G250.....		21

**Figura 8-** Classificação funcional COG das proteínas identificadas de *M. synoviae*..... 32

**Figura 9A-** Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente CHAPS de *M. synoviae* corado com

Coomassie		Blue
G250.....		33

**Figura 9B-** Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente CHAPS de *M. synoviae* corado com

Coomassie		Blue
G250.....		34

**Figura 10A-** Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente SB3-10 de *M. synoviae* corado com

Coomassie		Blue
G250.....		35

**Figura 10B-** Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente SB3-10 de *M. synoviae* corado com

Coomassie		Blue
G250.....		36

**Tabela 1-** Proteínas de membrana identificadas de *M. hyopneumoniae* (pH 3-10)..... 22

**Tabela 2-** Proteínas de membrana identificadas de *M. synoviae* (pH 3-10).....37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ABEF</b>	Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango
<b>ASB-14</b>	(3-[N,N-Dimetil(3-miristoilaminopropil)amônio]propanosulfonato)
<b>BRGene</b>	Instituto Nacional Brasileiro de Sequenciamento do Genoma
<b>CHAPS</b>	(3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato)
<b>COG</b>	“ <i>Clusters of Orthologous Groups</i> ”
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EM</b>	Espectrometria de massa
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
<b>IEF</b>	Isoeletrofocalização
<b>MW</b>	“Molecular weight” – Massa molecular
<b>PES</b>	Pneumonia enzoótica suína
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico

<b>PIGS</b>	Rede Sul de Análise do genoma
<b>PNSA</b>	Plano Nacional de Sanidade Avícola
<b>PPLO</b>	“pleuropneumonia-like organisms”
<b>PRDC</b>	Complexo de doença respiratória suína
<b>PRRSV</b> suína	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína
<b>PTS</b>	Sistema fosfotransferase
<b>SB3-10</b>	(3-(Decildimetilamônio)propanosulfonato)
<b>SDS PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
<b>SIV</b>	Vírus da influenza suína
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil) aminometano

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 GÊNERO <i>Mycoplasma</i> .....	1
1.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	3
1.3 <i>Mycoplasma synoviae</i> .....	5
1.4 PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	7
1.5 PROTEÔMICA.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 CEPAS DE MYCOPLASMA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	12
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	12
3.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	13
3.4 DIGESTÃO TRÍPTICA DAS PROTEÍNAS, ESPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	14
<b>14. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
4.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	16
4.2 <i>Mycoplasma synoviae</i> .....	31

<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 GÊNERO *Mycoplasma*

Morfologicamente, os micoplasmas são considerados as menores bactérias existentes capazes de se auto-replicarem, possuindo um genoma reduzido (580-2200 kb) e com alto conteúdo de A+T (adenina e timina) (ZUO et al., 2008). As espécies de *Mycoplasma* são frequentemente deficientes em intermediários do metabolismo energético devido a seu reduzido genoma. Esta deficiência no metabolismo, no processo celular e na produção de energia impõe um estilo de vida estritamente dependente do hospedeiro, do qual os micoplasmas adquirem a maioria de seus nutrientes (ARRAES et al., 2007; RAZIN et al., 1998;). Assim, nestes organismos ocorrem grandes perdas da capacidade metabólica e regulatória que normalmente possui uma bactéria Gram-positiva. Como muitos dos genes para o ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia respiratória estão ausentes no genoma dos micoplasmas, a conservação de energia é limitada ao nível de fosforilação de substrato através da glicólise e, em alguns casos, hidrólise da arginina (HALBEDEL E STULKE, 2007). Existem mais de 120 espécies de *Mycoplasmas* listadas no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dependendo da espécie e do hospedeiro, estes organismos podem ocorrer como comensais ou causar doenças inflamatórias crônicas, não sendo encontrados micoplasmas de vida livre. Os micoplasmas usualmente são tecido e hospedeiro específicos, provavelmente refletindo sua exigência nutricional natural. No entanto, há exemplos da presença de micoplasmas em hospedeiros e tecidos diferentes de seus habitats normais (KLEVEN, 2008; RAZIN et al., 1998). Além de fazerem parte da microbiota natural de alguns hospedeiros, eles são comumente encontrados parasitando plantas, mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Em animais são responsáveis pela pleuropneumonia contagiosa bovina e caprina, pneumonia enzoótica em suínos, doença respiratória crônica e artrite reumatóide em aves de corte, além de pneumonia e uretrite em humanos (NICHOLAS, AYLING E MCAULIFFE, 2009).

Taxonomicamente pertencem à classe *Mollicutes* (divisão Tenericutes), ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma* (WALKER, 2003). Diferenciam-se fenotipicamente de outras bactérias por seu reduzido tamanho (0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ ) e pela ausência de citoesqueleto e parede celular caracterizada pela deficiência de modulinas clássicas como lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico e fragmentos de mureína. Como a parede celular é normalmente substituída por uma membrana flexível, os micoplasmas são considerados bactérias gram-negativas, apesar de filogeneticamente estarem relacionados a bactérias gram-positivas (WASINGER et al., 2000; WOLF et al., 2004; ZUO et al., 2008). Esta ausência de parede celular é a característica usada para classificar os micoplasmas na classe *Mollicutes* (RAZIN, YOGEV E NAOT, 1998).

Os primeiros micoplasmas foram detectados em 1898 em tecidos de gado com artrite e pleuro-pneumonia, daí denominados “pleuropneumonia-like organisms” ou PPLO (DAVIS et al., 1973). Estas bactérias podem alojar-se intracelularmente sem destruir a célula hospedeira, à semelhança do que fazem alguns vírus e bactérias, assim como extracelularmente nos fluídos corporais (VASCONCELOS et al., 2005). A localização intracelular, mesmo por um curto período, pode proteger os micoplasmas contra efeitos do sistema imune do hospedeiro e de antibióticos, o que justifica a dificuldade de erradicação da infecção (RAZIN et al., 1998). Outra característica importante é a variação fenotípica da expressão das principais proteínas imunogênicas de superfície, a qual é considerada o fator mais relevante da patogênese (KLEVEN, 2008).

O seqüenciamento, montagem, anotações, e análises comparativas em sílico dos genomas de duas espécies de *Mycoplasma*: a cepa patogênica 7448 e a não patogênica J de *Mycoplasma hyopneumoniae* e a cepa 53 de *Mycoplasma synoviae* foram realizadas pelos consórcios Instituto Nacional Brasileiro de Seqüenciamento do Genoma (BRGene) e Rede Sul de Análise do genoma (PIGS), envolvendo um total de 28 laboratórios de seqüenciamento. Estes genomas foram então comparados com outros genomas de mycoplasmas já seqüenciados anteriormente para analisar aspectos evolutivos dos mycoplasmas. Além de rearranjos, foram encontradas alterações em seqüências de algumas adesinas, proteínas potencialmente envolvidas na patogenicidade. Comparações

genômicas revelaram também que a redução do genoma implicou na perda de vias metabólicas redundantes, com a manutenção de rotas alternativas nas diferentes espécies (VASCONCELOS et al., 2005).

## ***1.2 Mycoplasma hyopneumoniae***

*M. hyopneumoniae* é considerado o causador primário da pneumonia enzoótica suína (PES), doença crônica e altamente contagiosa. A infecção por esta bactéria acarreta consideráveis perdas econômicas à produção de carne suína devido, principalmente, à significativa perda de peso dos animais, gastos com tratamento e redução de preços das carcaças (WILTON et al., (2009). Apesar de a doença não estar associada à alta mortalidade, apresenta alta morbidade, causa tosse crônica e retardo do crescimento dos animais (CALUS et al., 2007; OBOEBULEN, 1981). *M. hyopneumoniae* é um patógeno extracelular que se fixa na superfície da mucosa do epitélio ciliado da traquéia, brônquios e bronquíolos, formando microcolônias ao longo dos cílios e resultando na sua destruição, morte de células epiteliais e na perda do sistema de defesa mucociliar. A perda desse mecanismo de defesa predispõe o hospedeiro a infecções mais severas ocasionadas por bactérias secundárias. A aderência de *M. hyopneumoniae* ao epitélio ciliado é um pré-requisito para o início da infecção. A PES é uma doença infecciosa crônica, principalmente caracterizada por uma broncopneumonia catarral (WILTON et al., 2009) que afeta animais de todas as idades, porém a forma clínica da doença ocorre com mais frequência naqueles em fase de crescimento. A transmissão do agente pode ocorrer pelo contato direto das secreções respiratórias do suíno portador ou por micropartículas eliminadas durante os acessos de tosse (STEVENSON, 1998; WILTON et al., 2009).

O *M. hyopneumoniae* também interage com as células imunes do trato respiratório o que resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, interleucinas e na ativação de linfócitos. Esta interação minimiza a habilidade do sistema imune de responder efetivamente a qualquer infecção (MIMS et al., 1995). Por fixar-se firmemente à mucosa respiratória, o patógeno escapa das defesas naturais do

hospedeiro, podendo sua localização no lúmen explicar a dificuldade de eliminação do agente (YAMAMOTO, 1994).

A exposição ao *M. hyopneumoniae* é predominante no mundo todo, com uma incidência aproximando-se de 100% dos rebanhos, sendo que 80% dos suínos inspecionados no abate ou nos laboratórios de diagnóstico apresentam evidências (lesões ou anticorpos) de exposição prévia ao *M. hyopneumoniae* (GUERRERO et al., 1990). Por ser altamente prevalente em quase todas as áreas de produção de suínos no mundo, medidas de controle da infecção são consideradas importantes (MAES et al., 2008).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) prevê para 2010 um aumento na produção mundial de carnes de 286,1 milhões de toneladas, o que significará um crescimento de 1,6% em relação ao ano de 2009. E a carne suína, como nos anos anteriores, continuará a ser a mais produzida mundialmente, com 38,0% do total, seguida pelas carnes de ave e bovina (Suinocultura Industrial, 2009). Além disso, a suinocultura brasileira exhibe indicadores de produtividade comparáveis aos países desenvolvidos. O Brasil continua na quarta posição na produção mundial de carne suína e o estado de Santa Catarina possui a maior e mais desenvolvida suinocultura do país.

As doenças respiratórias são economicamente devastadoras para a suinocultura mundial (CHAE, 2005). *M. hyopneumoniae* é uma das mais importantes causas de doenças em suínos, envolvida, além da PES, no complexo de doença respiratória suína (PRDC). Juntamente com este patógeno outras bactérias secundárias como *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, e *Actinobacillus pleuropneumoniae* participam deste complexo (KIM et al., 2003). O termo PRDC descreve uma doença respiratória severa que se desenvolve pela combinação de patógenos de origem viral e bacteriana. Dentre os patógenos citados, os mais comuns são *M. hyopneumoniae*, o vírus da influenza suína (SIV), o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) e bactérias secundárias subsequentes (KIM et al., 2003; PINTO et al., 2009).

As vacinas contra *M. hyopneumoniae* disponíveis apresentam alto custo de produção e conferem apenas uma proteção parcial, não impedindo o estabelecimento da infecção (LIN et al., 2003). Porém estas vacinas melhoram significativamente o ganho de peso dos animais e reduzem a severidade dos sintomas e minimizam os efeitos inflamatórios, reduzindo assim os gastos com medicamentos

(THACKER, THACKER E JANKE, 2001). Geralmente elas estimulam a produção de anticorpos IgG e IgA dirigidos contra o patógeno e, assim, a mudança e diminuição da produção da citocina pró-inflamatória TNF (THACKER et al., 2000). A compreensão das características de patogenicidade da bactéria *M. hyopneumoniae* pode ajudar no desenvolvimento de novas estratégias no controle da PES (CONCEIÇÃO et al., 2006; NICHOLAS et al., 2009).

### ***1.3 Mycoplasma synoviae***

*Mycoplasma synoviae* é responsável pela infecção denominada sinovite em aves como galinhas e perus. Primeiramente, os sintomas e lesões ocorrem no trato respiratório, seguido das junções articulares e sistema urogenital (NASCIMENTO et al., 2000). Dentre os sintomas mais comuns estão as inflamações catarrais nas fossas e seios nasais, faringe, traquéia e brônquios, inchaços das patas e nas articulações dos membros anteriores (asas) e posteriores (patas), limitando a movimentação da ave. Nas articulações o quadro típico é o de sinovite, uma inflamação da membrana sinovial que reveste internamente a cápsula articular (KLEVEN et al., 2008). Todos os sintomas ocorrem devido à predileção do *M. synoviae* pelas membranas mucosas e serosas dos tratos respiratório e reprodutivo das aves (MONTEIRO et al., 2004). Embora a manifestação subclínica seja uma das principais características da micoplasmose causada por *M. synoviae*, a infecção geralmente induz a um prejuízo significativo para a saúde do hospedeiro, podendo provocar a supressão do sistema imune. A infecção sistêmica pode envolver vários órgãos incluindo os sacos aéreos, fígado, baço, cérebro e músculo esquelético (BUIM et al., 2009; SENTÍES-CUÉ, SHIVAPRASAD E CHIN, 2005).

As micoplasmoses aviárias são doenças endêmicas que, quando em efeito sinérgico com outras infecções, causam aumento das taxas de mortalidade e condenação da carcaça do animal. Trazem grandes prejuízos à avicultura por reduzirem as taxas de eclosão de ovos e a conversão alimentar em cerca de 20%, podendo levar à queda do ganho de peso do animal em até 30% (FIORENTIN et al., 1991). Uma vez introduzido em uma granja, o micoplasma é de difícil eliminação

e, na maioria das vezes, a retirada dos animais do ambiente se faz necessária para a erradicação do agente (KLEVEN, 1997).

O agente etiológico é transmitido verticalmente por meio dos ovos e aves infectadas, determinando a permanência do patógeno em uma granja, o que potencializa os efeitos da infecção (MAROIS et al., 2005).

O controle da infecção é teoricamente simples, especialmente devido à transmissão se dar pelos ovos e a falta de parede celular do patógeno torná-lo suscetível a influências do ambiente. Porém, o controle do patógeno, que ainda não é alcançado com sucesso, consiste em três aspectos: prevenção, medicação e vacinação (KLEVEN, 2008). Além do abate de aves já contaminadas ou a separação destas do restante dos animais, o uso de antibióticos também colabora no controle, já que a redução dos sintomas é acompanhada pela redução da eliminação de ovos contaminados. No entanto, mesmo o uso de antibióticos sendo uma ferramenta efetiva para redução da transmissão por ovos, o combate definitivo dos sinais clínicos e lesões não pode depender dos mesmos e o uso contínuo pode desenvolver resistência (KLEVEN, 2008; STANLEY et al., 2001).

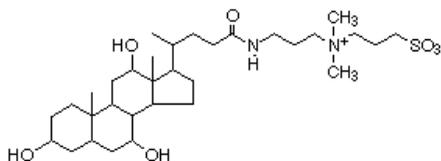
Em relação à vacinação contra *M. synoviae* as opções incluem vacina inativada, emulsão de bacterinas e vacinas vivas ou recombinantes. Elas devem ser potentes e devidamente administradas antes da exposição ao patógeno. O tipo e a cepa da vacina utilizada devem levar em consideração fatores como custo, via de administração e virulência das cepas (KLEVEN, 2008).

No Brasil a inspeção para *M. synoviae* é exercida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que determina as ações a serem seguidas para certificação dos lotes, incluindo as exigências de biossegurança e os testes laboratoriais a serem procedidos (CONCEIÇÃO et al., 2006). Devido a alguns países importadores e o Ministério da agricultura e abastecimento brasileiro exigirem certificação de núcleos ou estabelecimentos avícolas livres de micoplasmoses aviárias (Portaria Nº 44, de 02 de outubro de 2001-Ministério da agricultura), isso obriga o sacrifício de matrizes, ocasionando ainda mais prejuízos econômicos.

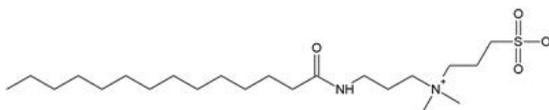
## 1.4 PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Em qualquer célula as proteínas de membrana são parte da interface entre o meio extra e intracelular ou entre o interior e o exterior de uma organela celular (SANTONI, 2007). A identificação e caracterização de proteínas de membrana é um desafio crucial, já que muitas dessas proteínas estão envolvidas em funções celulares essenciais como transdução de sinais, interação e reconhecimento célula-célula, célula-patógeno e célula-substrato, osmoregulação, nutrição e metabolismo, além de todas as possíveis modificações na funcionalidade celular que podem surgir posteriormente à atividade destas proteínas de membrana (KASHINO et al., 2007; ZHAO et al., 2004).

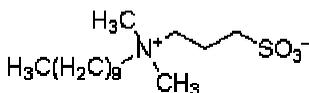
As proteínas presentes na membrana plasmática podem ser integrais (ancoradas na bicamada lipídica diretamente e com a cadeia polipeptídica atravessando-a, através de uma região transmembrana ou modificação lipídica) ou associadas, isto é, ancoradas na bicamada lipídica através de interações não-covalentes com proteínas integrais de membrana ou outra proteína de membrana associada (ZHAO et al., 2004). Estes tipos de proteínas requerem um balanço cuidadoso entre o ambiente hidrofílico e lipofílico, o que é muito variável para as diferentes proteínas. A natureza hidrofóbica das proteínas de membrana, associada aos métodos bioquímicos de análise que empregam, em sua maioria, solventes aquosos, acarretam dificuldades de análise das mesmas (SANTONI et al., 2000; VAISAR, 2009). Assim, para auxílio na solubilização de proteínas de membrana, foram utilizados três detergentes de características zwitteriônicas (eletricamente neutros ou íons híbridos): CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato) (figura 1), ASB-14 (3-[N,N-Dimetil(3-miristoilaminopropil)amônio]propanosulfonato) (figura 2), SB3-10 (3-(Decildimetilamônio)propanosulfonato) (figura 3). As proteínas são normalmente extraídas por lise das células na presença destes detergentes que desorganizam a bicamada lipídica das membranas e solubilizam as proteínas. Os detergentes auxiliam mantendo as moléculas em solução por dissociar os agregados e desenovelar as proteínas (SANTONI et al., 2000).



**Figura 1: Estrutura química do detergente zwitteriônico CHAPS (Fonte: [www.gencompare.com](http://www.gencompare.com)).**



**Figura 2: Estrutura química do detergente zwitteriônico ASB-14 (Fonte: [www.gbiosciences.com](http://www.gbiosciences.com)).**



**Figura 3: Estrutura química do detergente zwitteriônico SB3-10 (Fonte: [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)).**

O sequenciamento completo do genoma de vários organismos tem demonstrado que as proteínas transmembrana representam cerca de 30% do total de proteínas. Entre os processos para análise de proteínas de membrana, a eletroforese bidimensional oferece a maior resolução disponível sendo um dos poucos métodos capazes de separar proteínas com suas modificações pós-traducionais (RABILLOUD, 2009; SANTONI et al, 2000).

Devido a essas proteínas serem centrais na atividade celular, elas são importantes também em ações farmacológicas, demonstrado pelo sucesso de fármacos que agem modulando a atividade de proteínas de membrana. Estas proteínas têm sido usadas como alvo de fármacos, anticorpos monoclonais e no auxílio em diagnósticos.

Assim, a identificação e análise das mesmas tornam-se relevantes, já que os fatores imunogênicos dos micoplasmas encontram-se, em sua maioria, na membrana (KAHANE E RAZIN , 1969; ZHAO et al., 2004). Além disso, a falta de parede celular e membranas intracitoplasmáticas destes organismos facilita a separação da membrana dos micoplasmas em uma forma relativamente pura (ROTTEM et al., 1993).

## 1.5 PROTEÔMICA

Na análise global das proteínas expressas pelo genoma de um organismo ou tecido específico, vêm sendo aplicadas técnicas de proteômica, que têm como objetivo isolar e identificar proteínas, estudar suas propriedades, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações protéicas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK et al., 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas, mas uma imagem dinâmica com dados da expressão de proteínas sob condições definidas e sua distribuição na célula (CASH, 1998). Os complexos de proteínas são o primeiro nível de organização do proteoma celular (KUHNER et al., 2009). A proteômica fornece uma ligação entre proteínas e seus genes codificadores e, portanto, uma ligação entre a fisiologia celular e a genética. Isso se mostra relevante, já que inúmeros projetos genoma, que vêm sequenciando genes de organismos inteiros, geram uma grande quantidade de informações que, independentemente, não traduzem o funcionamento real das complexas redes reguladoras e o metabolismo da célula (em estado normal ou patológico) (SANTOS et al., 2004).

As técnicas proteômicas estão inseridas em diversas áreas da biologia, bioquímica, toxicologia. São comumente aplicadas em estudos de proteoma de organismos na análise de sua patogenicidade e adaptação ao hospedeiro. Além disso, são aplicadas na análise de diversas doenças como as cardiovasculares, neurológicas, diabetes e obesidade, parasitárias e infectocontagiosas, rejeição em transplantes e

na oncologia. A proteômica se aplica, ainda, na busca de biomarcadores e alvos terapêuticos que auxiliem no diagnóstico e tratamento de doenças e busca por novos fármacos (mais específicos e com menos efeitos colaterais) (KUHNER et al., 2009; SANTOS et al., 2004).

As três amplas áreas da proteômica são a **expressão proteômica**, que define a abundância de proteínas, o **mapeamento celular** ou a **proteômica celular**, que delimita as interações proteína-proteína e distribuição proteica organela-específica e a **proteômica estrutural**, a qual caracteriza a estrutura tridimensional das proteínas. Com estas abordagens, proteínas são estudadas em uma escala global através da combinação sinérgica de tecnologias com bons resultados, incluindo eletroforese de gel de poliacrilamida uni e bidimensional (separação das proteínas por ponto isoeletrico e posteriormente, por massa molecular), espectrometria de massa, cromatografia líquida multidimensional e técnicas de bioinformática (CRAVATT et al., 2007; PARDANANI et al., 2002).

A eletroforese bidimensional é um método fundamental de separação e identificação de proteínas na proteômica, pois possibilita a visualização de um grande número de proteínas simultaneamente e suas diferentes isoformas (HAYNES et al., 2000; LOW et al., 2002). No entanto, a técnica apresenta ainda algumas limitações como reprodutibilidade e boa resolução de proteínas pouco abundantes e/ou hidrofóbicas e de alta massa molecular. Devido à sua alta hidrofobicidade, proteínas de membrana apresentam baixa solubilidade e demonstram uma tendência para agregação. Dessa forma, o processo de solubilização de proteínas é um passo muito importante em estudos proteômicos, tornando-se um desafio aos pesquisadores (BRAUN et al., 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise proteômica das proteínas de membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma synoviae*. Assim, a criação de um mapa proteômico preliminar das proteínas de membrana de duas espécies bacterianas podem servir de base para futuras pesquisas de vacinas com ampla cobertura entre as cepas destas bactérias, além de desenvolver um meio de diagnóstico rápido e eficiente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo adequado para extração de proteínas de membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *M. synoviae*;
- Preparo de extratos protéicos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *M. synoviae*;
- Análise unidimensional dos extratos;
- Análise dos extratos por focalização isoelétrica e SDS PAGE (2D PAGE);
- Isolamento de proteínas (“bandas”) de interesse;
- Identificação e caracterização das proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF;
- Construção de um mapa preliminar das proteínas de membrana identificadas de cada espécie.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CEPAS DE MYCOPLASMA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As amostras analisadas foram fornecidas pelo Laboratório de Sanidade Animal-EMBRAPA (Concórdia, Santa Catarina). Foram utilizadas as cepas 53 de *M. synoviae* e 7448 de *M. hyopneumoniae*. As células foram então incubadas em caldo Frey quando *M. synoviae* e meio Friis quando *M. hyopneumoniae*. A incubação foi feita a 37°C/24h e então uma alíquota foi novamente crescida nos respectivos meios a 37°C/24h até que a cultura alcançasse a fase log indicada por turbidez e mudança de cor. As células foram então centrifugadas e lavadas com o próprio meio e armazenadas a - 80°C (FIORENTIN et al., 2003).

#### 3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os extratos de ambas as espécies foram preparados como descrito (PINTO et al., 2007; WESTERMEIER E NAVEN, 2002) com algumas modificações. Células de 2 l de cultura foram ressuspensas em solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl, pH 7,2 com adição de 40 µg/ml de inibidor de proteases (Fenilmetilsulfonil fluoreto, Sigma Aldrich). As células foram lisadas por sonicação em 6 ciclos de 25 segundos com intervalos de 1 minuto no gelo e centrifugadas por 1 hora a 12000 x g a 4°C. Após centrifugação o sobrenadante e o precipitado foram separados. Ao precipitado foram então adicionados 2 ml de 25 mM de Tris-HCl, 7 M uréia, 2 M tiouréia, 0,2% IPG buffer pH 3-10 (tampão que confere o pH durante a primeira dimensão, Amersham Biosciences), 40 mM de ditiotreitól (DTT) e, em amostras separadas, foram adicionados os respectivos detergentes: 4% de CHAPS, 1% ASB 14 e 2% SB3-10. Após a adição dos agentes solubilizantes e desagregantes as amostras foram colocadas em agitação por uma hora e centrifugadas a 12000 x g a 4°C para separação das proteínas solubilizadas. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o sistema 2-D Quanti Kit (Amersham Biosciences) e precipitadas para separação dos contaminantes como ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e sais

provenientes dos tampões utilizados com o sistema 2D clean-up kit (Amersham Biosciences). As amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A eletroforese bidimensional foi realizada usando o método de Westermeier e Naven (2002) com algumas modificações. Alíquotas contendo aproximadamente 300  $\mu\text{g}$  de proteínas foram diluídas em solução de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% (p/v) CHAPS, 18 mM DTT, 0,5% IPG buffer pH 3-10 e traços de azul de bromofenol) (PINTO et al., 2007). As amostras foram então aplicadas nas tiras de pH imobilizado (IPG strips de 13cm, pH 3-10; GE Healthcare) e reidratadas passivamente por 12 horas a temperatura ambiente no aparato IPGphor strip holder com 250  $\mu\text{l}$  de amostra, contendo aproximadamente 300  $\mu\text{g}$  de proteína e cobertas com 1 ml de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes durante a reidratação. A isoeletrofocalização (IEF) foi conduzida usando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), a  $20^{\circ}\text{C}$  em quatro passos com voltagem total de 5750 VH e corrente máxima de 25  $\mu\text{A}$ /strip (passo 1: 300 V - 200 V/h; passo 2: 1000 V - 300 V/h; passo 3: 5000 V - 4000 V/h; passo 4: 5000 V - 1250 V/h). As proteínas focalizadas nos strips foram reduzidas com 1% DTT e alquiladas com 2,5% iodoacetamida antes de submetidas à segunda dimensão com solução de equilíbrio contendo 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 2% (p/v) SDS, 6 M uréia, 30% (v/v) glicerol, 1% azul de bromofenol. A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 12% a 20 mA inicialmente, seguido por 50 mA e 150 V. Após os géis foram fixados em solução fixadora contendo 8% de ácido fosfórico e 50% etanol e corados em solução de coloração contendo 0,1% de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad), 20% metanol, 10% sulfato de amônio e 2% ácido fosfórico. Os géis corados foram então escaneados com ImageScanner (Amersham Biosciences) e as imagens analisadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). O programa determinou automaticamente a massa molecular de cada banda por comparação com o marcador de massa molecular utilizado na segunda dimensão e o ponto isoeletrico utilizando o gradiente de pH da

primeira dimensão. A análise dos géis foi feita em duplicata em dois experimentos independentes com diferentes amostras para confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

### **3.4 DIGESTÃO TRÍPTICA DAS PROTEÍNAS, ESPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

A digestão das proteínas no gel foi feita como previamente descrita (SHEVCHENKO et al., 1996) com algumas modificações. As bandas dos géis foram retirados manualmente e descorados com três lavagens utilizando 300 µl de solução de descoloração contendo 25 mM bicarbonato de amônio, 50% acetonitrila e então desidratados com 100 µl acetonitrila. Os fragmentos de géis foram secos em sistema de concentração à vácuo (Eppendorf). Após secos os fragmentos de gel foram colocados em gelo e adicionados de 10 µl de solução de protease (Tripsina Gold, Promega) a 10 µg/ml em 25 mM bicarbonato de amônio e incubados por 16 horas a 37 °C. Após a incubação os peptídeos trípticos foram extraídos em três passos de extrações com solução contendo 30 µl de 50% acetonitrila e 5% ácido trifluoroacético por 30 minutos. Finalmente os extratos de peptídeos concentrados foram secos em sistema à vácuo e estocados a -20°C até a análise.

A análise por espectrometria de massa (EM) foi feita em espectrômetro MALDI-TOF Autoflex spectrometer (Bruker Daltonics) no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular- UFPR. Os peptídeos extraídos foram ressuspensas em 10 µl ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e uma amostra de 1 µl da digestão concentrada foi misturada à solução de matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinâmico (10 mg/ml em 0,1% TFA em 1:1 acetonitrila/metanol). Metade desta mistura foi aplicada na placa de MALDI (Bruker Daltonics) para cristalizar em temperatura ambiente. O espectro foi adquirido em modo íon positivo usando uma voltagem de aceleração de 20 kV e frequência de laser de 50 Hz. A calibração externa foi feita usando uma mistura de peptídeos com 200 tiros para cada espectro de calibração (4 passos de 50 tiros ) sempre que

possível. Os espectros das amostras foram obtidos por acúmulo de 200 tiros e analisados pelo software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). O padrão de massas obtido para cada amostra foi comparado com o padrão de massas gerado “*in silico*”, a partir do banco de dados do NCBI nr usando o programa MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Os parâmetros de busca foram os seguintes: Categoria Mycoplasma, 100 ppm de tolerância, cisteínas carbamidometiladas e metioninas oxidadas. Os dados de probabilidade de combinação pelo score, massa molecular, ponto isoelétrico, número de peptídeos equivalentes e porcentagem de cobertura dos peptídeos em relação à proteína foram combinados para identificação das proteínas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micoplasmoses são enfermidades infecciosas caracterizadas por diferentes formas de manifestações clínicas que acometem animais de corte e domésticos, entre eles, suínos, galinhas, perus, caprinos e ovinos. Entre eles estão o *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae*, agentes infecciosos que trazem grandes prejuízos à saúde dos animais, debilitando-os e facilitando a manifestação de outros patógenos.

Em uma análise proteômica as proteínas não devem ser apenas extraídas, mas também estar completamente solúveis, sem interações moleculares (proteína-RNA/DNA, proteína-proteína) e, no caso da eletroforese 2-D, permanecerem solúveis quando atingirem seus pontos isoelétricos na primeira dimensão (WALKER, 2005).

Para auxiliar na solubilização das proteínas, no presente trabalho, foram utilizados detergentes com características zwitteriônicas como CHAPS, ASB-14 e SB3-10 para aumentar a solubilidade de proteínas em geral. O objetivo foi separar por eletroforese bidimensional e identificar por espectrometria de massas, proteínas de membrana expressas por células em cultura de *M. hyopneumoniae* crescidas em condições padrão. Com os dados adquiridos de identificação de proteínas de membrana associados com os resultados do trabalho de outros membros de nosso laboratório, mapeamos as proteínas proeminentemente expressas de ambas as espécies de Mycoplasma.

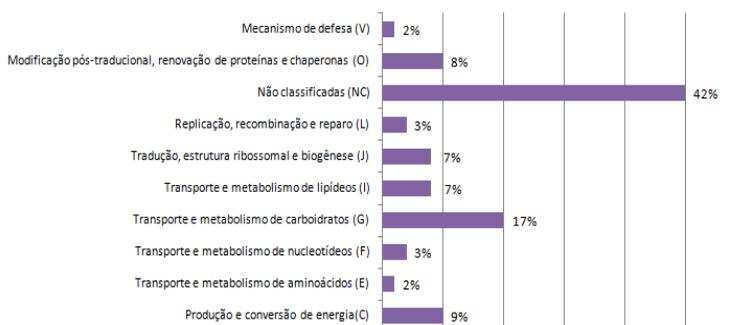
#### 4.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

*M. hyopneumoniae* é o agente primário de uma das doenças respiratórias mais comuns em suínos mundialmente, a pneumonia enzoótica suína. Causa grandes perdas econômicas à suinocultura, já que, além de diminuir o aumento de peso dos animais e apresentar alta morbidade, a infecção permite a ação de patógenos secundários. Apesar da possibilidade de controle da doença pelo uso de antibióticos, a vacinação ainda é a estratégia mais eficiente para o controle e prevenção da doença (SIMIONATTO et al., 2009). Apenas algumas proteínas antigênicas de *M. hyopneumoniae* têm sido identificadas, como a lipoproteína P65 (KIM et al., 1990), P36 citosólica, L-lactato desidrogenase (STRASSER et al., 1991), lipoproteína P46 (FUTO et al., 1995), P97 (ZHANG; YOUNG; ROSS, 1995), ribonucleotídeo redutase – NRDF (FAGAN et al., 1996) e as lipoproteínas Mhp378 e Mhp651 (MEENS et al., 2006).

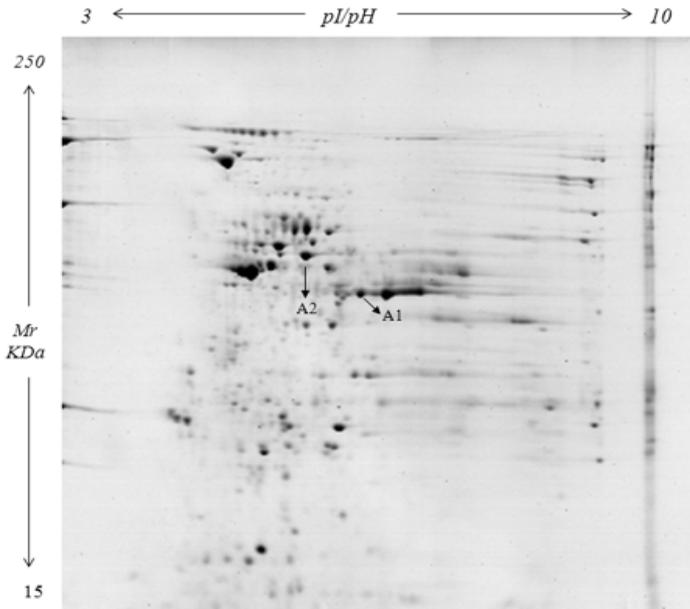
Neste trabalho foram analisados no total, seis géis bidimensionais de *M. hyopneumoniae* na faixa de pH 3-10, tendo duplicatas para cada detergente utilizado. Em relação à resolução em número de bandas, o detergente ASB-14, mostrou-se mais eficiente, resultando em média 300 bandas por gel. Já para CHAPS e SB3-10, foram resolvidos 141 e 186 bandas por gel, respectivamente. No total, foram identificadas por EM, 24 proteínas de membrana (10 proteínas distintas) além de 36 proteínas citoplasmáticas (26 proteínas distintas), perfazendo um total de 60 proteínas identificadas. Em relação à identificação de proteínas, o detergente ASB-14 também foi o mais eficiente, totalizando aproximadamente 70% das identificações.

Para serem consideradas efetivamente identificadas realizamos uma combinação dos dados de escore, pI/MW, sequência de cobertura e peptídeos correspondentes das proteínas analisadas. Todas as proteínas identificadas foram atribuídas a classes funcionais de proteínas COG (*Clusters of Orthologous Groups*). Foi possível identificar proteínas pertencentes às classes: (C) Produção e conversão de energia (5); (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos (1); (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos (2); (G) Transporte e metabolismo de carboidratos (11); (I) Transporte e metabolismo de lipídeos (4); (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (4); (L) Replicação, recombinação e reparo (4); (O) Modificação pós-

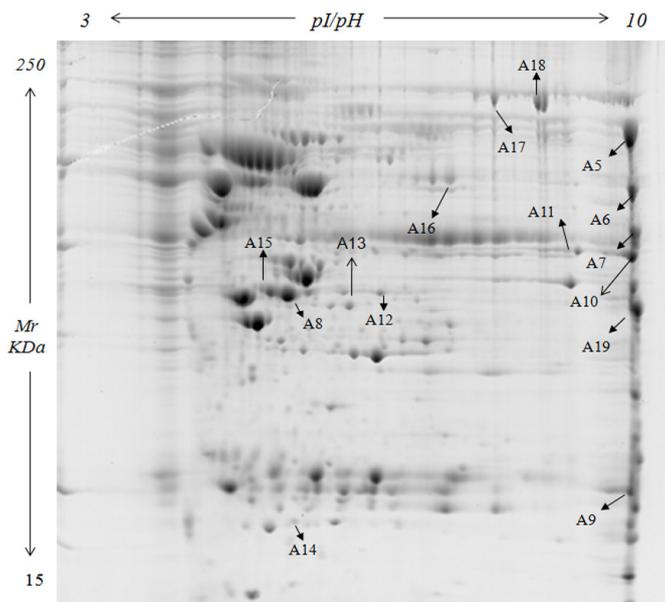
traducional, renovação de proteínas e chaperonas (6); (V) Mecanismo de defesa (1) e (NC) Proteínas não Classificadas (24) (Figura 4). Em relação às proteínas de membrana, as identificadas pertencem às categorias Metabolismo e transporte de carboidratos (6), Mecanismo de defesa (1) e Não classificadas (16) (Figuras 5, 6A, 6B e 7 e Tabela 1).



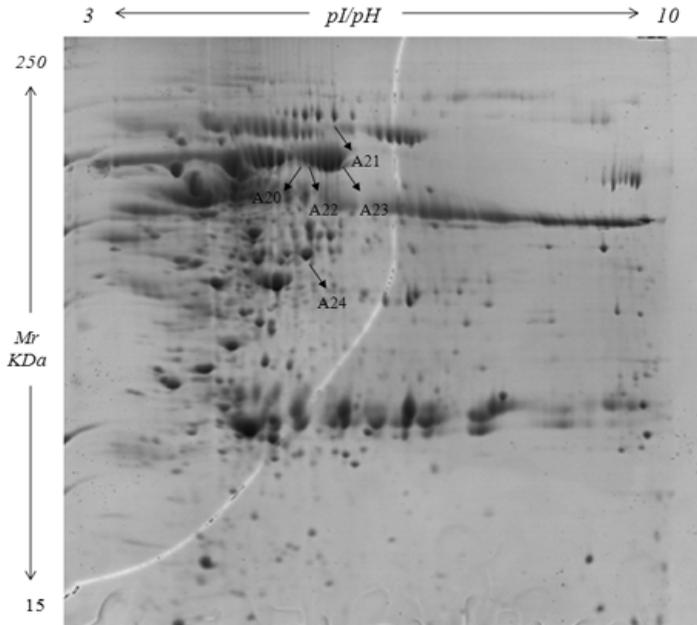
**Figura 4: Classificação funcional COG das proteínas identificadas de *M. hyopneumoniae*. Porcentagens das proteínas identificadas mostradas em categorias.**



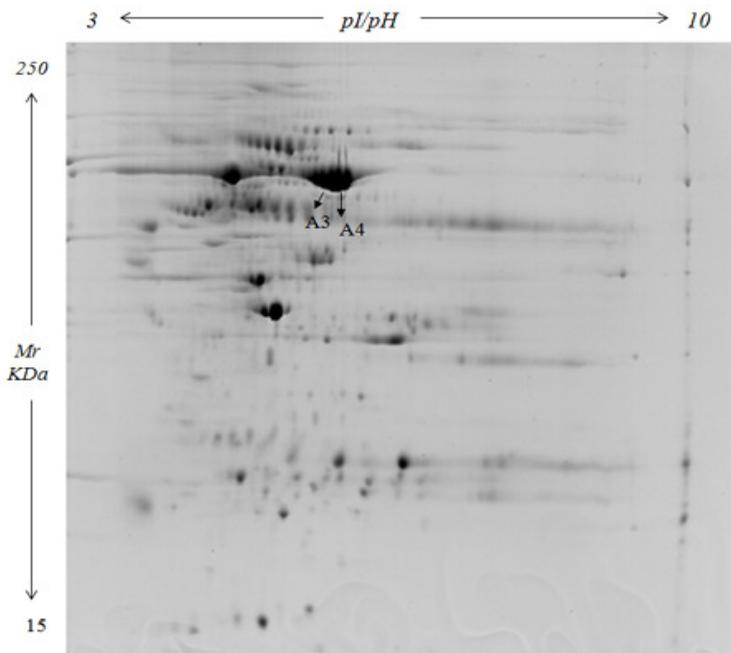
**Figura 5: Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu$ g de proteínas de fração extraída com detergente CHAPS de *M. hyopneumoniae* corado com Coomassie Blue G250.**



**Figura 6A:** Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu$ g de proteínas de fração extraída com detergente ASB-14 de *M. hyopneumoniae* corado com Coomassie Blue G250.



**Figura 6B:** Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu\text{g}$  de proteínas de fração extraída com detergente ASB-14 de *M. hyopneumoniae* corado com Coomassie Blue G250.



**Figura 7: Gel bidimensional 12% contendo 300 µg de proteínas de fração extraída com detergente SB3-10 de *M. hyopneumoniae* corado com Coomassie Blue G250.**

Tabela 1: Proteínas de membrana identificadas de *M. hyopneumoniae* (pH 3-10).

<i>Spot</i>	<i>Proteína<sup>a</sup></i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>Escore Mascot</i>	<i>Sequência de cobertura (%)</i>	<i>Peptídeos equivalentes</i>	<i>Locus Gênico</i>	<i>COG<sub>b</sub></i>
A1	Sistema PTS manitol- Componente específico IIA	5.62/16652	6,51/34901	30	16	2	mtlF MHP7448_0548	G
A2	Antígeno precursor de superfície 46K	7.60/45760	6,11/37979	70	17	8	MHP7448_0513	G
A3	Adesina ciliar P97	9,53/2270	5,84/66520	35	75	2	P97	NC
A4	Adesina ciliar P97	9,53/2270	6,00/65836	31	74	2	P97	NC
A5	Proteína P97	9.02/122821	10/85029	188	28	28	MHP7448_0198	NC

<b>A6</b>	<b>Adesina P97</b>	<b>8.98/123709</b>	<b>10/64019</b>	<b>148</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>MHP7448_0198</b>	<b>NC</b>
<b>A7</b>	<b>Possível proteína de superfície p216</b>	<b>8.50/216487</b>	<b>10/52908</b>	<b>56</b>	<b>9</b>	<b>15</b>	<b>MHP7448_0496</b>	<b>NC</b>
A8	Antígeno precursor de superfície 46K	7.60/45760	5,71/42213	181	40	13	MHP7448_0513	G
<b>A9</b>	<b>Proteína precursora de membrana p76</b>	<b>5.98/34029</b>	<b>10/25086</b>	<b>62</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>MHP7448_0497</b>	<b>NC</b>
<b>A10</b>	<b>Proteína precursora de membrana p76</b>	<b>8.67/159678</b>	<b>10/48452</b>	<b>84</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>MHP7448_0497</b>	<b>NC</b>

<b>A11</b>	<b>Proteína de membrana p76</b>	<b>8.67/159678</b>	<b>9,21/49639</b>	<b>68</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>MHP7448_0497</b>	<b>NC</b>
A12	transportador ABC de ligação à lipoproteína P37	8.88/48252	6,87/42727	40	9	5	MHP7448_0360	NC
A13	Antígeno precursor de superfície 46K	7.60/45760	6,89/43455	85	22	8	MHP7448_0513	G
<b>A14</b>	<b>Possível proteína de superfície p216</b>	<b>8.50/216487</b>	<b>5,93/21795</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>MHP7448_0496</b>	<b>NC</b>
A15	Antígeno precursor de superfície 46K	7.60/45761	5,38/43299	112	34	13	MHP7448_0513	G

A16	Transportador ABC – proteína de ligação ao ATP	9.37/91180	7,68/68735	33	4	3	MHP7448_0340	V
A17	Lipoproteína	6.57/83940	8,30/107619	47	10	6	MHP7448_0366	NC
A18	Possível proteína de superfície p216	8.50/216487	8,81/105241	46	4	8	MHP7448_0496	NC
A19	Proteína P102	9.40/102268	10/40123	37	3	3	MHP7448_0199	NC
A20	Adesina ciliar P97	9.53/2270	5,59/75657	37	75	2	P97	NC
A21	Proteína P146	8.82/148795	6.04/96784	41	4	4	MHP7448_0663	NC
A22	Adesina ciliar P97	9.53/2270	5,67/75657	39	75	2	P97	NC

---

<b>A23</b>	<b>Adesina ciliar P97</b>	<b>9.53/2270</b>	<b>6,09/75328</b>	<b>35</b>	<b>75</b>	<b>2</b>	<b>P97</b>	<b>NC</b>
A24	Antígeno precursor de superfície 46K	7.60/45761	5,7/44434	134	31	12	MHP7448_0513	G

---

Proteínas com valores de pI e peso molecular experimentalmente determinados distintos dos valores preditos estão indicados em negrito.

- a) Identificação de proteínas de acordo com o banco de dados MASCOT.
- b) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, mitose e meiose; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Metabolismo e transporte de coenzimas; (I) Transporte e metabolismo de lipídeos; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (O) Modificação pós-traducional, renovação de proteínas e chaperonas; (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (R) Função geral predita; (S) Função desconhecida; (V) Mecanismo de defesa e (NC) Proteínas não Classificadas.

Dentre as proteínas identificadas neste trabalho há proteínas importantes implicadas no processo de citoaderência ciliar, um pré-requisito para a colonização de *M. hyopneumoniae* ao epitélio ciliado da traquéia, brônquios e bronquíolos de suínos e posterior desenvolvimento da doença. Estudos prévios mostram que o processo de citoaderência é um complexo processo envolvendo múltiplos produtos gênicos e mediado por interações receptor-ligante, inibido, principalmente, por muitos carboidratos como sulfato dextrana, heparina, sulfato de condroitina, mucina e outros. Isto se deve ao fato de que a ligação de bactérias patogênicas a moléculas como glicosaminoglicanos encontradas na superfície das células ser um reconhecido passo na patogênese de doenças (JENKINS et al., 2006). Estes resultados sugerem que os receptores para *M. hyopneumoniae* no epitélio ciliado do trato respiratório de suínos formariam glicoconjugados (ZHANG, YOUNG, ROSS, 1995). Já foi demonstrado que *M. hyopneumoniae* adere apenas ao epitélio ciliado do trato respiratório e não a outras células do sistema respiratório, o que é um contraste em relação a outros micoplasmas que aderem a vários tipos celulares (HSU et al., 1998; RAZIN E JACOBS, 1992). Foi relatado por Hsu e colaboradores (1997) que a atividade de aderência ciliar é promovida, além de outros fatores, pela proteína P97 (bandas A3, A4, A5, A6, A20, A22 e A23), uma adesina de superfície de 97 kDa. Esta proteína possui duas regiões na porção C-terminal da molécula conhecidas como R1 e R2 que compreendem distintos peptídeos. Para ligarem-se aos cílios do trato respiratório, um mínimo de seis cópias sucessivas de R1 são necessárias. Embora a função de R2 *in vivo* seja desconhecida, sua presença, juntamente com R1, é requerida na ligação a glicosaminoglicanos presentes na superfície de células infectadas (JENKINS et al., 2006; MINION et al., 2000). Já a especificidade de ligação aos cílios está associada ao elemento de repetição R1 (MINION et al., 2000). Esta adesina ciliar P97 contém um domínio N-terminal, o qual é proteoliticamente processado na superfície da célula. Djordjevic e colaboradores (2004) demonstraram que a adesina ciliar é clivada em múltiplos sítios gerando uma família de peptídeos que permanecem em associação com a célula ou proteínas da matriz extracelular e que é essencial à sua função.

Além de P97, a proteína de membrana P102 (banda A19) também sofre esta modificação pós-traducional e os produtos de clivagem permanecem associados à superfície de culturas de células *in*

*vitro* de *M. hyopneumoniae* (DJORDJEVIC et al., 2004). A análise da sequência de DNA em torno do gene de P97 revelou um operon composto por duas ORFs (*Open reading frames*): a correspondente a P97 e outra que codifica para uma proteína de 102,3 kDa designada como P102 (HSU e MINION, 1998). Estruturalmente, a proteína P102 indica a presença de alto conteúdo de  $\alpha$ -hélices seguido por uma sequência hidrofóbica transmembrana e seu papel na adesão ciliar é apenas predito, já que interage diretamente com P97 (JENKINS et al., 2006). Evidências têm demonstrado que ambas as proteínas são membros de famílias parálogas (ADAMS, PITZER E MINION, 2005).

Além das proteínas P97 e P102, outras proteínas de membrana de *M. hyopneumoniae* já foram também implicadas no processo de adesão ciliar: P110, P65, LppS e LppT P76 (bandas A9, A10 e A11), P216 e P146, tendo sido as três últimas identificadas neste trabalho (VASCONCELOS et al., 2005). Elas são importantes proteínas essenciais para o processo patológico, além de serem utilizadas em estudos na busca de novos métodos de diagnóstico e vacinas (OGAWA et al., 2009; MAROIS et al., 2009; SIMIONATTO et al., 2009). Além da clivagem proteolítica sofrida por P97 e P102, Pinto e colaboradores (2007) confirmaram a ocorrência de produtos proteolíticos também de P76.

Wilton e colaboradores (2009) também demonstraram a clivagem pós-traducional de uma possível proteína de 216 kDa (P216) (bandas A7, A14 e A18), paróloga à P97, gerando os fragmentos P120 N-terminal e P85 C-terminal. Esta é a quarta proteína de superfície, juntamente com P97, P120, P76 que apresentam esta clivagem. Em todos os casos os fragmentos de clivagem permanecem na superfície das células de *M. hyopneumoniae* indicando que os mesmos apresentam importante papel na patogênese (WILTON et al., 2009). Esta modificação pós-traducional de clivagem proteolítica, observadas em várias proteínas, pode ser confirmada nas massas moleculares observadas menores em relação as massas teóricas das mesmas.

Também associada ao processo de adesão celular, P146 (banda A21) é uma proteína homóloga a LppS, uma lipoproteína rica em repetições de serina na extremidade carboxiterminal utilizada na análise epidemiológica molecular de *M. conjunctivae* (BELLOY et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2005). Devido a esta homologia, P146 foi

usada na investigação da variabilidade de cepas de *M. hyopneumoniae* por Mayor e colaboradores (2007).

A família de transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette) forma uma das maiores e mais conhecidas e estão presentes em bactérias e eucariotos. São transportadores localizados na membrana que acoplam a hidrólise de ATP para ativar o transporte transmembrana (efluxo e influxo) de uma série de compostos tais como íons, açúcares, lipídios, esteróis, peptídeos, proteínas e fármacos. Estruturalmente um transportador ABC procariótico consiste de três componentes: geralmente duas proteínas integrais de membrana (cada uma com seis segmentos transmembrana), duas proteínas periféricas que se ligam e hidrolisam ATP e uma lipoproteína que se liga ao substrato. Muitos destes genes para três proteínas formam um operon no genoma de bactérias (ZHAO et al., 2004).

Foi possível identificar 2 proteínas pertencentes a esta família de transportadores: um transportador ABC de ligação à lipoproteína P37 (ABC-P37) (banda A12) e um transportador ABC de ligação à ATP (ABC-ATP) (banda A16). No primeiro caso, a fração identificada do transportador foi a lipoproteína que se liga ao substrato P37, uma lipoproteína de membrana que faz parte do operon (que codifica duas proteínas adicionais) similar ao sistema de transporte periplasmático de bactérias Gram-negativas. Foi demonstrado originalmente que a proteína P37 de *M. hyorhinae* induz a invasão desta bactéria em células de sarcoma com alterações de senescência, sendo que esta invasividade é revertida nas células quando estas são pré-tratadas com anticorpos contra esta proteína (DUDLER et al., 1988). Acredita-se que P37 tem função análoga à lipoproteína extracitoplasmática, já que micoplasmas têm apenas uma membrana. Desde que foi identificada, P37 indica grande correlação entre *M. hyorhinae* com carcinoma gástrico e de cólon, câncer esofágico e de pulmão (GONG et al., 2008; SIPPEL et al., 2009). Apesar do gene que codifica para o transportador desta proteína estar presente no genoma de *M. hyopneumoniae*, esta ainda possui função desconhecida na espécie.

A segunda proteína desta família encontrada foi o transportador ABC de ligação ao ATP responsável por se ligar e hidrolisar o ATP, necessário para o transporte ativo de moléculas através da membrana (NICOLÁS et al., 2007).

Já a proteína P46 (bandas A2, A8, A13, A15 e A24) de *M. hyopneumoniae*, identificada em variadas isoformas, é um antígeno de

superfície de 46 kDa, reconhecida pelo método de ELISA por anticorpos monoclonais e aplicada com sucesso no diagnóstico de pneumonia enzoótica suína por ELISA e PCR em tempo real (DUBOSSON et al., 2004; FUTO et al., 1995; OKADA et al., 2005) além de utilizado na busca de novas vacinas (CHEN et al., 2008). Neste segundo caso, ratos imunizados com um coquetel de antígenos, incluindo P46, induziram resposta imune, sendo que apenas P46 promoveu resposta humoral. O gene de P46 foi o primeiro gene identificado no qual o códon CGG, que geralmente em *Mycoplasmas* é um códon sem sentido, codifica para o aminoácido arginina, fato confirmado pelo seqüenciamento da proteína de *M. hyopneumoniae* (FUTO et al., 1995). Pinto e colaboradores (2007) identificaram P46 como imunogênica, além das já imunogênicas P97, P146, P216 e LppT.

O sistema fosfotransferase (PTS) é o principal mecanismo usado por procariotos para a captação de carboidratos, particularmente hexoses e dissacarídeos. Este sistema consiste de dois componentes: Enzima I/proteína fosfocarregadora de histina localizadas no citoplasma e Enzima II (EII) localizada na membrana, responsável pelo transporte específico de carboidratos. Cada complexo de EII consiste de um ou dois domínios hidrofóbicos integrais de membrana (C e D) e dois domínios hidrofílicos (A e B). Este sistema catalisa a captação de carboidratos e sua respectiva conversão em fosfoésteres, facilitando a difusão dos compostos pela membrana (ROBILLARD E BROOS, 1999). Nós identificamos o componente IIA manitol-específico do sistema PTS (banda A1), alocado na membrana da célula e responsável por catalisar a captação e fosforilação de D-manitol. A expressão deste operon de manitol é regulado por um fator de transcrição repressor, proposto pela primeira vez em *Escherichia coli*, chamado MtlR (TAN et al., 2009).

Além das proteínas envolvidas na adesão ciliar e sistemas de transporte de moléculas, foi também identificada uma lipoproteína MHP7448\_0366 de 737 aminoácidos (banda A17).

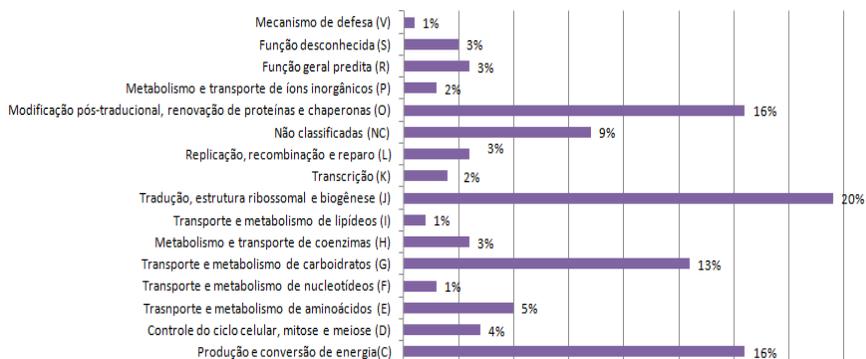
## 4.2 *Mycoplasma synoviae*

Dentre as 12 espécies de mycoplasmas que infectam galinhas e perus, *M. synoviae* é considerado um dos mais patogênicos e causa grandes perdas econômicas na produção de aves de corte (BENCINA, 2001). Os fatores responsáveis pelas diferenças consideráveis de tropismo tecidual, invasividade e patogenicidade das cepas ainda são pouco definidas (DUSANIC et al., 2009). A micoplasmose causada por *M. synoviae* está associada, principalmente, com doença respiratória crônica, sinovite e artrite. Os sintomas clínicos incluem tosse, secreção nasal, inflamações das articulações e lesões nos sacos aéreos, mas em alguns casos, não há manifestações clínicas (RAVIV E KLEVEN, 2009). Sob condições desconhecidas, a patologia pode tornar-se sistêmica e causar vasculite sistêmica e alterações em numerosos órgãos. Devido à possibilidade deste patógeno ser transmitido verticalmente através dos ovos, manter o rebanho livre de qualquer contaminação é essencial (BENCINA, 2001; KLEVEN, 2008).

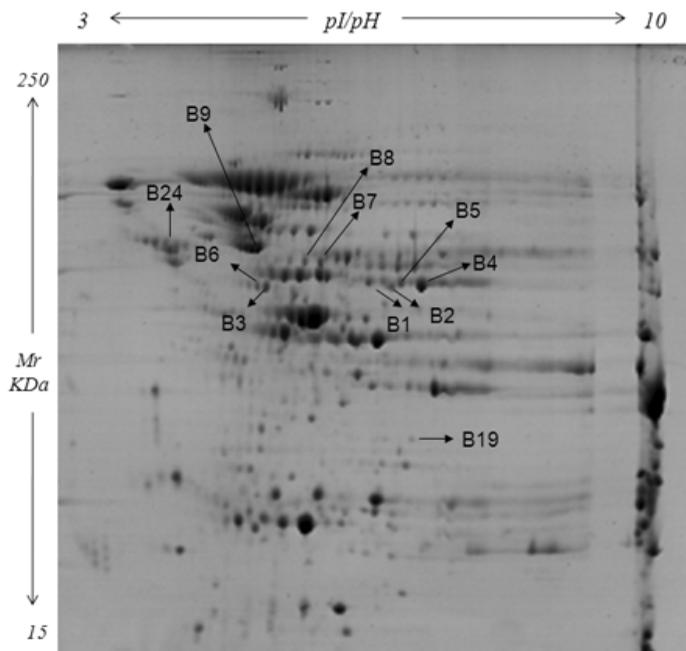
A partir de amostras de *M. synoviae* foram analisados, no total, seis géis bidimensionais na faixa de pH 3-10, tendo duplicatas para cada detergente utilizado. O detergente CHAPS mostrou-se mais eficiente em relação à resolução em número de bandas, resultando em média 270 bandas por gel. Já para os detergentes ASB-14 e SB3-10, foram resolvidos 240 e 257 bandas por gel, respectivamente. No total, foram identificadas por EM, 36 proteínas de membrana (10 proteínas distintas) além de 165 proteínas citoplasmáticas (98 proteínas distintas), perfazendo um total de 201 proteínas identificadas. De todas as proteínas identificadas, a maioria foi partir de amostras solubilizadas com o detergente CHAPS.

Todas as proteínas identificadas foram atribuídas às classes funcionais de proteínas COG. Foi possível identificar proteínas pertencentes às classes: (C) Produção e conversão de energia (31); (D) Controle do ciclo celular, mitose e meiose (7); (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos (10); (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos (3); (G) Transporte e metabolismo de carboidratos (26); (H) Metabolismo e transporte de coenzimas (6); (I) Transporte e metabolismo de lipídeos (2); (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (39); (K) Transcrição (4); (L) Replicação, recombinação e reparo (6); (O) Modificação pós-traducional, renovação de proteínas e

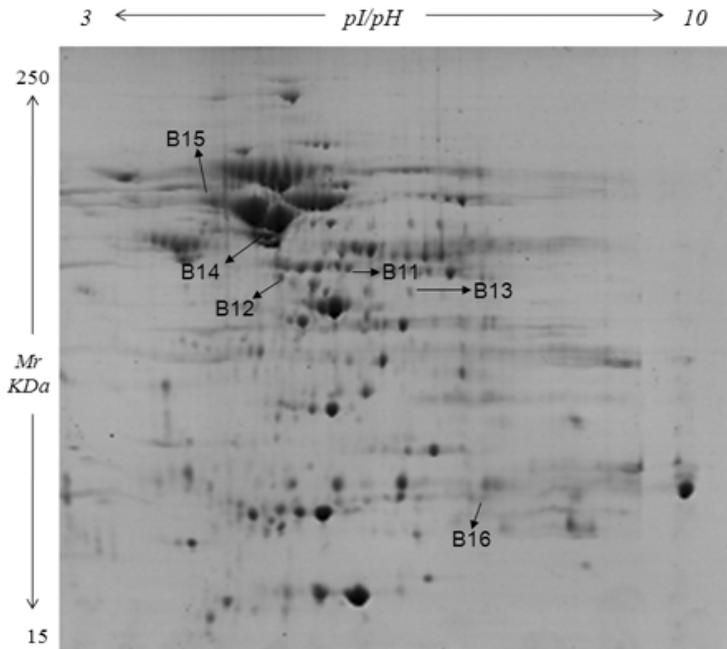
chaperonas (31); (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos (3); (R) Função geral predita (6); (S) Função desconhecida (5); (V) Mecanismo de defesa (1) e (NC) Proteínas não Classificadas (17) (Figura 8). Em relação às proteínas de membrana, as identificadas pertencem às categorias Produção e conversão de energia (12), Transporte e metabolismo de aminoácidos (1), Metabolismo e transporte de carboidratos (6), Metabolismo e transporte de íons inorgânicos (3), Mecanismo de defesa (1) e Não classificadas (4) (Figuras 9A, 9B, 10A e 10B e Tabela 2).



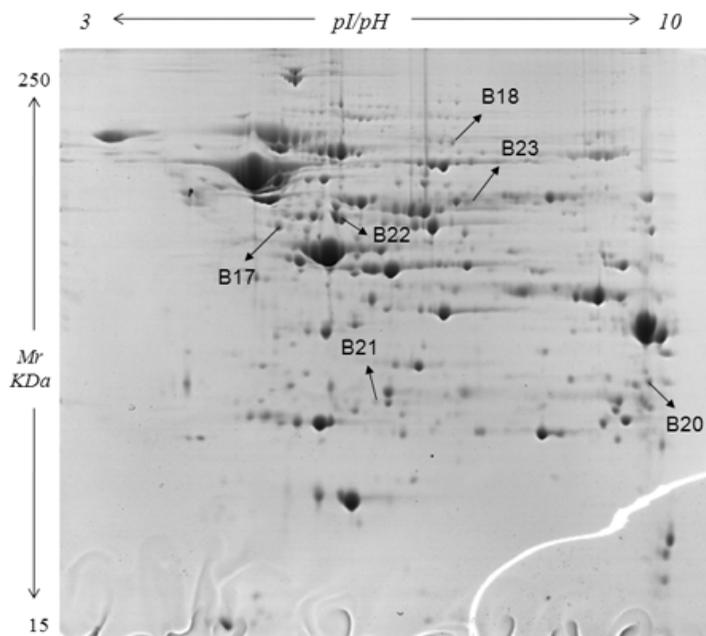
**Figura 8: Classificação funcional COG das proteínas identificadas de *M. synoviae*. Porcentagens das proteínas identificadas mostradas em categorias.**



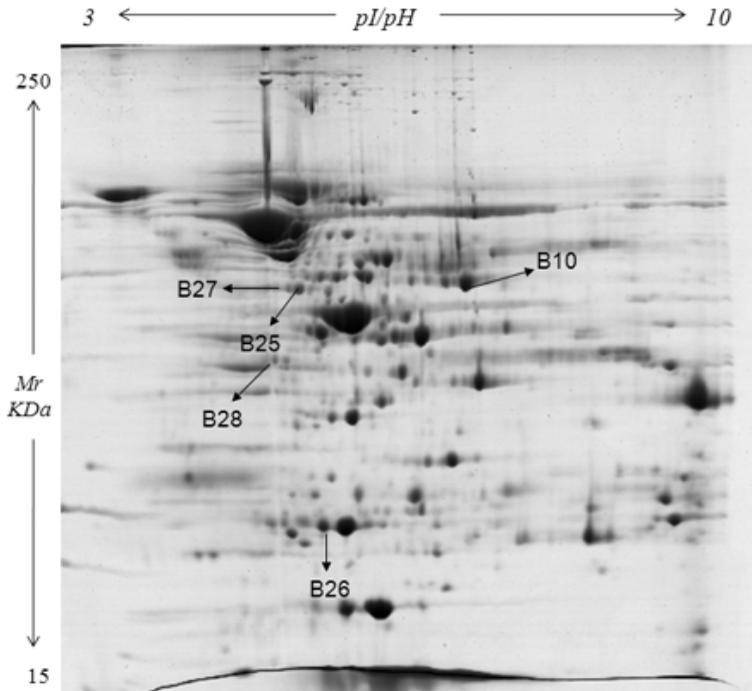
**Figura 9A:** Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu\text{g}$  de proteínas de fração extraída com detergente CHAPS de *M. synoviae* corado com Coomassie Blue G250.



**Figura 9B:** Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu$ g de proteínas de fração extraída com detergente CHAPS de *M. synoviae* corado com Coomassie Blue G250.



**Figura 10A:** Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu$ g de proteínas de fração extraída com detergente SB3-10 de *M. synoviae* corado com Coomassie Blue G250.



**Figura 10B:** Gel bidimensional 12% contendo 300  $\mu$ g de proteínas de fração extraída com detergente SB3-10 de *M. synoviae* corado com Coomassie Blue G250.

**Tabela 2: Proteínas de membrana identificadas de *M.synoviae* (pH 3-10).**

<i>Banda</i>	<i>Proteína<sup>a</sup></i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>Escore MASCOT</i>	<i>Sequência de cobertura (%)</i>	<i>Peptídeos equivalentes</i>	<i>Locus Gênico</i>	<i>COG<sup>b</sup></i>
B1	Fosfopiruvato hidratase	6.59/49357	6,53/50743	106	21	7	eno MS53_0009	G
B2	Fosfopiruvato hidratase	6.59/49357	6,70/51024	135	34	12	eno MS53_0009	G
B3	F0F1 ATP sintase subunidade beta	5.37/50438	5,33/49617	138	32	11	atpD-3 MS53_0464	C

---

B4	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49357	7,14/49945	174	35	13	eno MS53_0009	G
B5	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49357	6,90/50556	174	35	13	Eni MS53_0009	G
B6	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,37/50438	5,22/49835	134	20	8	atpD-3 MS53_0464	C
B7	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,75/52574	5,95/56363	83	16	6	atpD-2 MS53_0160	C

---

B8	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,75/52574	5,77/56572	93	24	10	atpD-2 MS53_0160	C
B9	FOF1 ATP sintase subunidade alfa	5,70/57969	5,16/60119	119	34	14	MS53_0160	C
B10	Fosfopiruvat o hidratase	6,59/49357	7,22/48972	157	32	13	Eno MS53_0009	G
B11	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,76/50831	6,10/57687	117	43	17	atpD MS53_0405	C
B12	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,37/50438	5,35/55032	104	30	9	atpD-3 MS53_0464	C

---

B13	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,76/50831	6,76/51711	111	32	12	atpD MS53_0405	C
<b>B14</b>	<b>Fosfopiruvato hidratase</b>	<b>6,59/49358</b>	<b>5,12/67005</b>	<b>124</b>	<b>29</b>	<b>11</b>	<b>Eno MS53_0009</b>	<b>G</b>
B15	Possível transportador de glicerol subunidade A	9,67/45672	4,60/77436	40	10	3	MS53_0383	E
B16	Possível transportador ABC-proteína de ligação ao ATP	9,68/28529	7,43/27421	56	18	4	MS53_0086	P

---

B17	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,37/50438	5,41/46038	142	29	10	atpD-3 MS53_0464	C
<b>B18</b>	<b>Possível sistema PTS, componente IIB</b>	<b>7,66/10361</b>	<b>7,42/77843</b>	<b>40</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>MS53_0682</b>	<b>G</b>
B19	Transportador de cobalto, subunidade de ligação ao ATP	6,47/29760	7,03/31716	32	11	2	cbiO MS53_0659	P
B20	Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP	9,40/26186	9,69/26500	49	18	4	bcrA MS53_0130	V
B21	Transportador de cobalto, subunidade	6,47/29760	6,53/24923	30	18	3	cbiO MS53_0659	P

de ligação ao ATP								
B22	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,76/50830	6,16/47476	108	26	11	atpD MS53_0405	C
B23	Possível hemaglutinina de fase variável	7,68/42123	7,61/53298	23	7	2	MS53_0236	NC
B24	FOF1 ATP sintase subunidade alfa	5,70/57969	4,30/60341	80	17	9	atpA MS53_0407	C
B25	FOF1 ATP sintase subunidade beta	5,37/50438	5,45/47895	133	34	14	atpD-3 MS53_0464	C
B26	Possível hemaglutinina de fase variável	7,79/24824	5,71/24257	20	10	2	MS53_0243	NC

B27	Possível hemaglutinin a de fase variável	8.97/47093	5,34/48180	29	8	3	MS53_0236	NC
B28	Possível hemaglutinin a de fase variável	9.20/27329	5,20/36891	27	12	2	MS53_0219	NC

Proteínas com valores de pI e peso molecular experimentalmente determinados distintos dos valores preditos estão indicados em **negrito**.

- a) Identificação de proteínas de acordo com o banco de dados MASCOT.
- b) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, mitose e meiose; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Metabolismo e transporte de coenzimas; (I) Transporte e metabolismo de lipídeos; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (O) Modificação pós-traducional, renovação de proteínas e chaperonas; (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (R) Função geral predita; (S) Função desconhecida; (V) Mecanismo de defesa e (NC) Proteínas não Classificadas.

Participando do metabolismo energético, nós identificamos frações do complexo enzimático F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase, responsável por catalisar o passo final da fosforilação oxidativa, através do fluxo transmembrana de íons (DÜSER et al., 2009). A análise da sequência de DNA dos operons de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase de três espécies de mycoplasma indicam a presença das mesmas oito subunidades homólogas correspondentes de *E. coli*. Assim, por analogia, é assumido que em mycoplasmas o complexo F<sub>1</sub> é formado pelas cinco subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  e o complexo F<sub>0</sub> pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Ou seja, o complexo F<sub>0</sub> estaria inserido na membrana citoplasmática de mycoplasmas interagindo com o complexo F<sub>1</sub>, o qual estaria orientado para o citosol. A subunidade  $\alpha$  do complexo é a porção catalítica, enquanto as outras subunidades compreendem as porções regulatórias do efluxo de prótons (PYROWOLAKIS et al., 1998; WEBER E SENIOR, 2000). As frações identificadas em nosso trabalho compreendem as subunidades  $\alpha$  (bandas B9 e B24) e  $\beta$  (bandas B3, B6, B7, B8, B11, B12, B13, B17, B22 e B25). Mycoplasmas diferem da maioria das bactérias pela deficiência da cadeia transportadora de elétrons contendo citocromos, assim a função de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase parece estar restrita a manter o gradiente de prótons (DYBVIK E VOELKER, 1996; PYROWOLAKIS et al., 1998).

Identificamos também proteínas pertencentes à família de transportadores ABC: um possível transportador de glicerol (subunidade A) (banda B15), duas unidades da proteína de ligação ao ATP de transportador ABC (bandas B16 e B20) e um transportador de cobalto (subunidade de ligação ao ATP) (bandas B19 e B21). Como o genoma destas bactérias é bastante reduzido, assim é também sua capacidade metabólica. A análise de seus genomas revela que Mollicutes são capazes de utilizar açúcares como fonte de energia via glicólise, porém a via das pentoses fosfato é incompleta e genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs estão ausentes. Assim, os açúcares utilizados como fonte de carbono são transportados pelo já abordado sistema PTS (HALBEDEL et al., 2007). O transportador de glicerol é responsável pela translocação deste substrato através da membrana, processo importante, já que em muitos Mollicutes a patogenicidade está estreitamente ligada ao metabolismo do carbono. O glicerol como fonte de carbono é importante para Mycoplasmas desde que disponível no tecido epitelial e seu metabolismo resulte na formação de peróxido de hidrogênio, o principal fator de virulência destas bactérias

(HALBEDEL et al., 2007). Isso se deve ao fato de o genoma reduzido de mycoplasmas também acarretar num número menor de fatores de virulência, como citolisinas, toxinas e invasinas, comumente encontrados em outras bactérias patogênicas. Este peróxido de hidrogênio é proveniente da oxidação do glicerol, via que produz esta espécie reativa de oxigênio em substituição ao  $\text{NADH}_2$  (PILO et al., 2005). Em *Spiroplasma citri*, parasita de plantas, a regulação do metabolismo do carbono é crucial na adaptação ao metabolismo vegetal e de seus vetores artrópodes (ANDRÉ et al., 2003; HALBEDEL et al., 2007). Halbedel e colaboradores (2004) também relataram a influência do glicerol no metabolismo de *Mycoplasma pneumoniae*, que desencadeia a atividade de uma proteína quinase (Hpr) do sistema PTS e responsável pela fosforilação de alguns açúcares (HALBEDEL et al., 2007). Além disso, Pilo e colaboradores (2005) descreveram a influência do glicerol na patogenicidade de *Mycoplasma mycoides*. Associado também ao metabolismo energético foi possível identificar um possível componente IIB do sistema PTS (banda B18).

Em relação ao transportador de cobalto, nós identificamos a subunidade de ligação ao ATP deste transportador encontrado em procariotos e eucariotos. Este metal de transição é componente essencial de muitas enzimas e deve ser transportado para as células quando necessário. Este transportador ABC está associado com a via de biossíntese de cobalamina e, estruturalmente, é composto por duas proteínas de ligação ao ATP, duas proteínas transmembrana e uma proteína de ligação ao substrato (RODIONOV et al., 2009). Foi possível identificar também várias isoformas da possível proteína hemaglutinina VlhA de fase variável (bandas B23, B26, B27 e B28) não classificada nas categorias COG. *M. synoviae* sintetiza hemaglutininas, proteínas imunogênicas de expressão variável e localizadas na superfície das células (BENCINA, 2002). A clivagem pós-traducional de VlhA gera duas proteínas: MSPB (40-50 kDa) e MSPA (22 kDa) (LAVRIC et al., 2007), fato que justifica as variações de massa molecular nos dados obtidos. Devido à ausência de parede celular nos Mycoplasmas, as lipoproteínas de superfície têm um importante papel nas interações entre estas bactérias e seus hospedeiros. Uma das estratégias de adaptação adquirida pelos mycoplasmas é a variação antigênica destas proteínas de superfície (RAZIN et al., 1998; TOMII E KANEHISA, 1998). Hemaglutininas são proteínas envolvidas neste processo de variação antigênica. Narat e colaboradores (1998) relataram que *M. synoviae* é

capaz de sintetizar diferentes antígenos de superfície, os quais estão submetidos à expressão variável associada à hemaglutinação e hemadsorção. Este fato pode ser comprovado pela já elucidada associação de *M. synoviae* aos eritrócitos de aves infectadas e a ocorrência da variação gênica neste processo. Além disso, a mesma proteína pode estar envolvida no processo de adesão celular (NOORMOHAMMADI et al., 1997; NOORMOHAMMADI et al., 2000). Hemaglutininas são também aplicadas no diagnóstico clínico de *M. synoviae* (HAMMOND et al., 2009) e na diferenciação da contaminação por *M. synoviae* e *Mycoplasma. gallisepticum* (MARDASSI et al., 2005). Outra característica importante é que as frações catalíticas de hemaglutininas MSPB e MSPA são capazes de induzir a secreção de óxido nítrico em macrófagos, assim como de IL-6 e IL-1b em monócitos de aves infectadas por *M. synoviae* (LAVRIC et al., 2007).

Além do fator de alongação Tu, NADH oxidase, ATP sintase cadeia  $\beta$ , fator *trigger*, piruvato quinase e chaperona DnaK (todas elas proteínas identificadas em nossa análise proteômica), as proteínas hemaglutinina e fosfopiruvato hidratase, também identificadas em nosso trabalho, são consideradas as principais proteínas imunogênicas de *M. synoviae* segundo Bercic e colaboradores (2008). Entre as enolases, a proteína fosfopiruvato hidratase pode ser encontrada tanto no citosol de células procarióticas e eucarióticas quanto exposta na superfície e tem sido reportado que esta proteína é multifuncional. Além de sua função catalítica em vários tipos celulares, enolases associadas à membrana das células podem funcionar como receptores para certos ligantes em processos patológicos. Já foi relatado que a infecção de aves por *M. synoviae* induz a produção de anticorpos contra fosfopiruvato hidratase provenientes da bactéria. Estes anticorpos estão envolvidos numa variedade de doenças autoimunes, já que podem causar reação cruzada com as enolases do hospedeiro (BERCIC et al., 2008; PANCHOLI, 2001). Como a enolase da bactéria compartilha aproximadamente 53% de identidade de sequência com a enolase de frango, pode ser possível que anticorpos contra enolase de *M. synoviae* estejam envolvidos no processo autoimune causado pelo patógeno. No entanto, mais evidências são necessárias para elucidar este processo (BERCIC et al., 2008).

## 5. CONCLUSÕES

Dos seis géis analisados provenientes de amostras de proteínas de *M. hyopneumoniae* o detergente ASB-14 foi o mais eficiente na resolução e identificações de proteínas para esta espécie. Em nosso trabalho foram identificadas por EM 60 proteínas no total, sendo 24 proteínas de membrana (10 proteínas distintas) e 36 proteínas citoplasmáticas (26 proteínas distintas).

Estas proteínas de membrana identificadas pertencem as classes COG de Metabolismo e transporte de carboidratos, Mecanismo de defesa e proteínas não classificadas. Todas estas proteínas foram, em sua maioria, já identificadas no proteoma de outras espécies de mycoplasmas ou outras bactérias, além do relato de sua importância em *M. hyopneumoniae*. São exemplos as proteínas: P97, P102, P76, P216, P146, proteínas implicadas no processo de adesão ciliar, transportadores ABC e do sistema PTS e a proteína P46 já empregada no diagnóstico da pneumonia enzoótica suína. Todas são importantes proteínas no metabolismo das bactérias ou no processo patológico, além de poderem ser utilizadas em estudos na busca de novos métodos de diagnóstico e vacinas.

Em relação à espécie *M. synoviae*, em nosso trabalho nós identificamos 165 proteínas citoplasmáticas (98 proteínas distintas) e 36 proteínas de membrana (10 proteínas distintas) e o detergente mais eficiente em resolução de bandas e identificação de proteínas foi o CHAPS.

As proteínas de membrana identificadas atribuídas à classificação COG pertencem as categorias Produção e conversão de energia, Transporte e metabolismo de aminoácidos, Metabolismo e transporte de carboidratos, Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, Mecanismo de defesa e proteínas não classificadas. Dentre as proteínas de membrana identificadas estão proteínas importantes para o metabolismo das bactérias como FOF ATP-sintase, transportadores ABC para cobalto e glicerol e a fosfopiruvato hidratase que, além de sua função metabólica catalítica nas células, pode funcionar como receptor para ligantes em processos patológicos.

Todas as proteínas de membrana identificadas são parte da construção de um mapa proteômico preliminar das proteínas de membrana para as espécies de *M. hyopneumoniae* e *M. synoviae* com a

análise da eficiência de detergentes zwitteriônicos. Todos estes dados podem colaborar futuramente em pesquisas para o melhoramento de vacinas e diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

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

ANDRÉ, A., MACCHERONI, W., DOIGNON, F., GARNIER, M., RENAUDIN, J. Glucose and trehalose PTS permeases of *Spiroplasma citri* probably share a single IIA domain, enabling the spiroplasma to adapt quickly to carbohydrate changes in its environment. *Microbiology*. v.149, p.2687-2696, 2003.

ARRAES, F.B.M., CARVALHO, M.J.A., 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*. v.30, p.182-189, 2007.

BELLOY, L., JANOVSKY, M., VILEI, E.M., PILO, P., GIACOMETTI, M., FREY, J. Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: transmission across species in natural outbreaks. *Appl Environ Microbiol*. v.69, p.1913-1919, 2003.

BENCINA, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol*. v.31, p.535-547, 2002.

BENCINA, D., DROBNIC-VALIC, M., HORVAT, S., NARAT, M., KLEVEN, S.H., DOVC, P. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiol Lett*. v.203, p.115-123, 2001.

BERCIC, R.L., SLAVEC, B., LAVRIC, M., NARAT, M., BIDOVEC, A., DOVC, P., BENCINA, D. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Vet. Microbiol*. v.127, p.147-154, 2008.

BLACKSTOCK, W.P., WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* v.17, p.121-127, 1999.

BRAUN, R.J., KINKL, N., BEER, M., UEFFING, M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem.* v. 389, p.1033-1045, 2007.

BUIM, M.R., BUZINHANI, M., YAMAGUTI, M., OLIVEIRA, R.C., METTIFOGO, E., UENO, P.M., TIMENETSKY, J., SANTELLI, G.M.M., FERREIRA, A.J.P. *Mycoplasma synoviae* cell invasion: Elucidation of the Mycoplasma pathogenesis in chicken. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* [Epub ahead of print], 2009.

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

CASH, F. Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. *Anal.Chimica Acta.* v.372, p.121-145, 1998.

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* v.169, p.326-36, 2005.

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

CONCEIÇÃO, F. R., DELLAGOSTIN, O.A. Etiopathogenesis and immunoprofilaxis of Swine Enzootic Pneumonia. *Ciência Rural, Santa Maria,* v.36(3), 2006.

CRAVATT, B.F., SIMON, G.M., YATES, JR. 3RD. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature.* v.450, p.991-1000, 2007.

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H. S.; WOOD, W. B. Infecções bacterianas e micóticas. São Paulo: Ed. Art, 1973.

DJORDJEVIC, S.P., CORDWELL, S.T., DJORDJEVIC, M.A., WILTON, J., MINION, F.C. Proteolytic Processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae*. Cilium Adhesin. Infection and Immunity. v. 72, p. 2791-2802, 2004.

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

DUDLER, R., SCHMIDHAUSER, C., PARISH, R.W., WETTENHALL, R.E., SCHMIDT, T. A mycoplasma high-affinity transport system and the in vitro invasiveness of mouse sarcoma cells. EMBO J. v.7, p.3963-3970, 1988.

DUSANIĆ, D., BERČIĆ, R.L., CIZELJ, I., SALMIĆ, S., NARAT, M., BENCINA, D. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. Vet Microbiol. v.138, p.114-119, 2009.

DÜSER, M.G., BI, Y., ZARRABI, N., DUNN, S.D., BÖRSCH, M. The proton-translocating a subunit of F0F1-ATP synthase is allocated asymmetrically to the peripheral stalk. J Biol Chem. v.283, p.33602-33610, 2008.

DYBVIG, K., VOELKER, L.L. Molecular biology of mycoplasmas. Annu Rev Microbiol. v.50, p.25-57, 1996.

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

FIorentin, L., Balen, L., Jaenisch, F.R.F., Fialho, F.B. Virulência de amostras de *Mycoplasma synoviae* isoladas no Brasil. EMBRAPA–CNPISA, 1991; CT -186: p. 1-2.

Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T., Kawai, K. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine, J. Bacteriol. v.177, p.1915-1917, 1995.

Gong, M., Meng, L., Jiang, B., Zhang, J., Yang, H., Wu, J., Shou, C. p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. Mol Cancer Ther. v.7, p.530-537, 2008.

Guerrero, R.J. Respiratory disease: An important global problem in the swine industry. Proc Int. Congr. Pig Vet. Soc. v.11, p.98, 1990.

Halbedel, S., Hames, C., Stülke, J. In vivo activity of enzymatic and regulatory components of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Mycoplasma pneumoniae*. J Bacteriol. v.186, p.7936-7943, 2004.

Halbedel, S., Stülke, J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. Int J Med Microbiol. v. 297, p. 37-44, 2007.

Hammond, P.P., Ramírez, A.S., Morrow, C.J., Bradbury, J.M. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. Vet Microbiol. v.136, p.61-68, 2009.

Haynes, P.A., Yates, J.R. 3rd. Proteome profiling-pitfalls and progress. Yeast. v.17, p.81-87, 2000.

Hsu, T., Minion, F.C. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Gene. v.214, p.13–23, 1998.

Hsu, T., Artiushin, S., Minion, F.C. Cloning and Functional Analysis of the P97 Swine Cilium Adhesin Gene of *Mycoplasma*

*hyopneumoniae*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. v.179, p.1317-1323, 1997.

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. Infection and Immunity. v.74, p. 481-487, 2006.

KAHANE, I., RAZIN, S. Immunological analysis of *Mycoplasma* membranes. J Bacteriol. v.100, p.187-194, 1969.

KASHINO, Y., HARAYAMA, T., PAKRASI, H.B., SATOH, K. Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Journal of Chromatography B. v,849, p. 282-292, 2007.

KIM, J., CHUNG, H.K., CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. Vet J. v.166, p.251-256, 2003.

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. v.58, p.2637-2643, 1990.

KLEVEN, S. H. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. Poultry Science v.77, p.1146-1149, 2008.

KLEVEN, S.H. *Mycoplasma synoviae* infection, p. 220-228. In: CLANEK, B.W.; CLANEK, H.J.; BARNES, C.W.; BEARD, L.R.; SAIF, Y.M. Editora Diseases of poultry, 10<sup>th</sup>, 1997.

KÜHNER, S. Proteome Organization in a Genome-Reduced Bacterium. Science. v.326, p.1235, 2009.

LAVRIC, M., BENCINA, D., KOTHLOW, S., KASPERS, B., NARAT, M. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and

IL-1beta in chicken macrophages. *Vet Microbiol.* v.121, p.278-287, 2007.

LIN, J.H. et al. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *Journal of Veterinary Medicine Science.* v.65, p.69-74, 2003.

LOW, T.Y., SEOW, T.K., CHUNG, M.C. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics.* v.2, p.1229-1239, 2002.

MAES, D., SEGALES, J., MEYNS, T., SIBILA, M., PIETERS, M., HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology.* v.126, p.297-309, 2008.

MARDASSI, B.B., MOHAMED, R.B., GUERIRI, I., BOUGHATTAS, S., MLIK, B. Duplex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. *J Clin Microbiol.* v.43, p.948-958, 2005.

MAROIS, C., DORY, D., FABLET, C., MADEC, F., KOBISCH, M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J Appl Microbiol.* [Epub ahead of print], 2009.

MAROIS, C., PICAULT, J., KOBISCH, M., KEMPF, I. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *Vet. Res.* v.36, p.759-769, 2005.

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

MEENS, J., SELKE, M., GERLACH, G.-F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma*

hyopneumoniae lipoproteins Mhp378 and Mhp651, Vet. Microbiol. v.116, p. 85-95, 2006.

MINION, F.C., ADAMS, C., HSU, T. R1 Region of P97 Mediates Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Swine Cilia Infection and Immunity. v.68, p. 3056-3060, 2000.

MIMS, C.A., PLAYFAR, J.H., ROIT, I.M. et al. Estratégias para a sobrevivência dos parasitas e persistência da infecção. In: JAWETZ, E. *Microbiologia médica*. São Paulo: Manole, 1995; p.15.1-15.12.

MONTEIRO, M.C.G.B., ROSSINI, L.I. Problemas respiratórios em frangos de corte. In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004; cap. 14: 261-274.

NARAT, M., BENCINA, D., KLEVEN, S.H., HABE, F. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. Infect Immun. v.66, p.6004-6009, 1998.

NASCIMENTO, E.R. Mycoplasmoses. In: Macari M, Berchieri Jr. A, editores. Doenças das aves. Campinas: FACTA. p.217-24, 2000.

NICHOLAS, R. A. J., AYLING, R. D., MCAULIFFE L. Vaccines for Mycoplasma Diseases in Animals and Man. J. Comp. Path. v.140, p.85-96, 2009.

NICOLÁS, M.F., BARCELLOS, F.G., HESS, P.N., HUNGRIA, M. ABC transporters in *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*: Insights into evolution and pathogenicity. Genetics and Molecular Biology. v.30, p.202-211, 2007.

NOORMOHAMMADI, A.H., MARKHAM, P.F., DUFFY, M.F., WHITHEAR, K.G., BROWNING, G.F. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. Infect Immun. v.66, p.3470-3475, 1998.

NOORMOHAMMADI, A.H., MARKHAM, P.F., KANCI, A., WHITHEAR, K.G., BROWNING, G.F. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Mol Microbiol.* v.35, p.911-923, 2000.

OBOEGBULEN, S.I. Enzootic pneumonia of pigs: a review. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* v.29, p.269-274, 1981.

OGAWA, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., SANO, A., HIKONO, H., SHIBAHARA, T., YAGI, Y., SHIMOJI, Y. Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine.* v. 27, p. 4543-4550, 2009.

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

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* v.58, p.902-920, 2001.

PARDANANI, A., WIEBEN, E.D., SPELSBERG, T.C., TEFFERI, A. Primer on medical genomics. Part IV: Expression proteomics. *Mayo Clin Proc.* v.77, p.1185-1196, 2002.

PILO, P., VILEI, E.M., PETERHANS, E., BONVIN-KLOTZ, L., STOFFEL, M.H., DOBBELAERE, D., FREY, J. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol.* v.187, p.6824-6831, 2005.

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.* v.21, p.45 [Epub ahead of print], 2009.

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.* v.121, p.83-93, 2007.

PYROWOLAKIS, G., HOFMANN, D., HERRMANN, R. The subunit b of the F0F1-type ATPase of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* is a lipoprotein. *J Biol Chem.* v.273, p.24792-24796, 1998.

RABILLOUD T. Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis.* v.30 Suppl 1:S174-180, 2009.

RODIONOV, D.A., HEBBELN, P., EUDES, A., TER BEEK, J., RODIONOVA, I.A., ERKENS, G.B., SLOTBOOM, D.J., GELFAND, M.S., OSTERMAN, A.L., HANSON, A.D., EITINGER, T. A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol.* v.191, p.42-51, 2009.

RAVIV, Z., KLEVEN, S.H. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Dis.* v.53, p.103-107, 2009.

RAZIN, S., JACOBS, E. *Mycoplasma* adhesion. *J Gen Microbiol.* v.138, p.407-422, 1992.

RAZIN, S., YOGEV, D., NAOI, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* v.62, p.1094-1156, 1998.

ROBILLARD, G.T., BROOS, J. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta.* v.1422, p.73-104, 1999.

ROTTEM, S., BARILE, M.F. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* v.11, p.143-151, 1993.

SANTONI, V. Plant plasma membrane protein extraction and solubilization for proteomic analysis. *Methods Mol Biol.* v.355, p.93-109, 2007.

SANTONI, V., KIEFFER, S., DESCLAUX, D., MASSON, F., RABILLOUD, T. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis.* v.21, p.3329-3344, 2000.

SANTOS, P.M., TEIXEIRA, M.C., SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. *Métodos em Biotecnologia - Proteômica Quantitativa.* Boletim de Biotecnologia 7, 2004.

SENTÍES-CUÉ, G., SHIVAPRASAD, H.L., CHIN, R.P. Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. *Avian Pathol.* v.34, p.137-42, 2005.

SHEVCHENKO, A., JENSEN, O.N., PODTELEJNIKOV, A.V., SAGLIOCCO, F., WILM, M., VORM, O., MORTENSEN, P., SHEVCHENKO, A., BOUCHERIE, H., MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.93, p.14440-14445, 1996.

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

SIPPEL, K.H., ROBBINS, A.H., REUTZEL, R., BOEHLEIN, S.K., NAMIKI, K., GOODISON, S., AGBANDJE-MCKENNA, M., ROSSER, C.J., MCKENNA, R. Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein p37 of *Mycoplasma hyorhinis*. *J Bacteriol.* v.191, p.2585-2592, 2009.

STANLEY, W.A., HOFACRE, C.L., SPEKSNIJDER, G., KLEVEN, S.H., AGGREY, S.E. Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin. Avian Dis. v.45, p.534-539, 2001.

STEVENSON, G.W. Bacterial pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15. Proceedings. Birmingham: e IPVS, p.906-907, 1998.

STRASSER, M., FREY, J., BESTETTI, G., KOBISCH, M., NICOLET, J. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. Infect. Immun. v.59, p.1217-1222, 1991.

#### SUINOCULTURA INDUSTRIAL.

[http://www.suinculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/producao-mundial-de-carnes,20091215141426\\_T\\_839,20081118093812\\_F\\_643.aspx](http://www.suinculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/producao-mundial-de-carnes,20091215141426_T_839,20081118093812_F_643.aspx). Acesso em : 10 dez, 2009.

TAN, K., CLANCY, S., BOROVILLOS, M., ZHOU, M., HÖRER, S., MOY, S., VOLKART, L.L., SASSOON, J., BAUMANN, U., JOACHIMIAK, A. The mannitol operon repressor MtlR belongs to a new class of transcription regulators in bacteria. J Biol Chem. v.284, p.36670-36679, 2009.

THACKER, E.L., THACKER, B.J., JANKE, B.H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. Journal of Clinical Microbiology. v.39, p.2525-2530, 2001.

THACKER, E.L., THACKER, B.J., YOUNG, T.F., HALBUR, P.G. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine. v.18, p.1244-1252, 2000.

TOMII, K., KANEHISA, M. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. Genome Res. v.8, p.1048-1059, 1998.

VAISAR, T. Thematic review series: proteomics. Proteomic analysis of lipid-protein complexes. *J Lipid Res.* v.50, p.781-786, 2009.

VASCONCELOS, A.T.R., et al. Swine and Poultry Pathogens: the Complete genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology.* v.187, p.5568-5577, 2005.

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

WALKER, J.M. *The Proteomics Protocols Handbook. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3ed. Humana Press. New Jersey, 2005.

WASINGER, V.C., POLLACK, J.D., SMITH, I.H. The proteome of *Mycoplasma genitalium*: Chaps-soluble component. *Eur. J. Biochem.* v. 267, p.1571-1582, 2000.

WEBER, J., SENIOR, A.E. Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* v.1319, p.19-58, 1997.

WESTERMEIER, R., NAVEN, T. *Proteomics in Practice.* Editora Wiley VCH, 2002.

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

WOLF, M., MÜLLER, T., DANDEKAR, T., POLLACK, J.D. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int J Syst Evol Microbiol.* v.54, p.871-875, 2004.

YAMAMOTO, R. Mollicutes. *In*: BIBERSTEIN, E.L.; ZEE, Y. Tratado de microbiología veterinária. Zaragoza: Editorial Acribia. p.241-249, 1994.

ZHANG, Q., YOUNG, T.F., ROSS, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin, *Infect. Immun.* v.63, p.1013-1019, 1995.

ZHAO, Y., ZHANG, W., KHO, Y., ZHAO, Y. Proteomic Analysis of Integral Plasma Membrane Proteins. *Anal. Chem.*v. 76, p.1817-1823, 2004.

ZUO, L., WU, Y., YOU, X. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. *J Zhejiang Univ Sci B* v.10, p.67-76, 2008.