



Programa de Pós-Graduação em
BIOTECNOLOGIA
mestrado & doutorado

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS
CITOPLASMÁTICAS DE *Mycoplasma synoviae***

ANGELA CAMILA ORBEM MENEGATTI

**FLORIANÓPOLIS
FEVEREIRO DE 2010**

ANGELA CAMILA ORBEM MENEGATTI

ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS
DE *Mycoplasma synoviae*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Dr. Hernán Terenzi
Dr. Javier Vernal

Florianópolis
Fevereiro de 2010

Dedico essa dissertação às pessoas mais importantes da minha vida, à minha avó Clara (*in memoriam*), ao meu pai Geny (*in memoriam*) e à minha mãe Maria de Lourdes pelo amor e apoio incondicional.

Essa conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao professor, orientador, Dr. Hernán Terenzi pela oportunidade, pela orientação deste trabalho, pelos conhecimentos repassados e pelo apoio necessário.

Ao Dr. Javier Vernal pela paciência, pela orientação deste trabalho, pelos conselhos, pelos conhecimentos, pelo incentivo e pela amizade.

À Dra. Patrícia Severino pelas conversas, pelas sugestões, pela amizade e pelo incentivo.

À minha grande companheira e amiga de trabalho Carolina, pela enorme paciência, pela ajuda incondicional, pelos conhecimentos, por enfrentar junto comigo todas as dificuldades encontradas durante a elaboração deste trabalho, pelas conversas e por todo apoio.

Aos companheiros de trabalho e grandes amigos, Franciele, Jean, Priscila, Tiago, Manuel, Gabriela, Camila, Gabrielle e Gisele pelas conversas, pelo apoio, pelas experiências trocadas e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável e alegre.

Aos meus pais por todo apoio necessário, por acreditarem em mim, pelo incentivo, pela paciência, pela compreensão, por sempre apoiar os meus sonhos e por todo sacrifício que fizeram por mim até hoje.

Aos meus amigos queridos pelo apoio, pelo incentivo, pelas conversas, pela amizade, pelos momentos de felicidade e descontração, por acreditarem em mim e sempre estarem ao meu lado.

À Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pela oportunidade.

Aos órgãos de apoio financeiro CAPES, CNPq e FAPESC.

Aos colaboradores desse projeto, o Laboratório de Sanidade Animal – Setor de Biotecnologia de Suínos da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC e o Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que contribuíram à minha formação profissional e pessoal.

RESUMO

O *Mycoplasma synoviae* é um dos mais importantes patógenos de aves domésticas em todo o mundo, sendo o agente causador de doenças respiratórias, sinovites e doenças sistêmicas, e, por consequência, torna-se responsável por grandes perdas econômicas na produção avícola. Com a recente conclusão do sequenciamento do genoma do *M. synoviae*, deu-se novo impulso na realização de estudos pós-genômicos. O presente trabalho apresenta o mapa proteômico preliminar das proteínas citoplasmáticas do *M. synoviae*, desenvolvido utilizando a eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa. Os mapas proteômicos foram realizados em duas faixas de pH (pH 4 a 7 e pH 3 a 10), e em dois tamanhos de tiras de IPG (7 cm e 13 cm). As proteínas foram identificadas utilizando espectrometria de massa MALDI/TOF e a ferramenta de busca MASCOT. Baseado na sequência genômica um total de 42 sequências codificantes de DNA (CDSs) foram identificadas, sendo que as proteínas mais abundantes foram a chaperona DnaK, o fator de elongação Tu e a tiol peroxidase. De acordo com a classificação funcional, a maioria das proteínas identificadas pertence à classe de metabolismo (39%) e à classe de armazenamento e processamento de informação (29%). Finalmente, foi realizada uma análise imunológica, na qual identificamos duas proteínas antigênicas de *M. synoviae* reconhecidas pelo soro de animais imunizados com esse patógeno, sendo elas a frutose-bifosfato aldolase e a proteína hipotética MS53_0025. O mapa proteômico obtido será útil como referência para outras análises de expressão proteica em *M. synoviae*.

Palavras – Chave: *Mycoplasma synoviae*; proteômica; eletroforese bidimensional; espectrometria de massa; proteínas imunogênicas.

ABSTRACT

Mycoplasma synoviae is a major pathogen of poultry throughout the world, being the causative agent of respiratory diseases, synovitis and systemic diseases, and consequently, it is responsible for great economic losses in poultry production. Recently the sequencing of *M. synoviae* genome was concluded and this accomplishment has stimulated pos-genomic studies. This study presents the preliminary proteomic map of cytoplasmatic proteins of *M. synoviae*, constructed using two-dimensional gel electrophoresis in combination with mass spectrometry. The proteomic maps were produced in two pH ranges (pH 3-10 and pH 4-7), and using two different IPG strips lengths (7 cm and 13 cm). Proteins were identified using MALDI/TOF mass spectrometry and the search engine MASCOT. Based on the genome sequence of *M. synoviae*, a total of 42 different coding DNA sequences (CDSs) were identified. The most prominent proteins were the molecular chaperone DnaK, the elongation factor Tu and thiol peroxidase. According to the functional classification, the majority of the identified proteins belong to the class of metabolism (39%) and the class of information storage and processing (29%). Finally, we performed an immunological analysis which identified two antigenic proteins from *M. synoviae* recognized by sera from animals immunized with this pathogen. The proteome map obtained will be useful as reference for further analysis of protein expression in *M. synoviae*.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*; proteomics; two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry; immunogenic proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral do fluxo da análise proteômica.....	3
Figura 2. Representação esquemática da eletroforese bidimensional	6
Figura 3. Representação esquemática dos três principais componentes de um espectrômetro de massa para análise proteômica	8
Figura 4. Representação do processo de ionização por MALDI.....	9
Figura 5. Analisador TOF	10
Figura 6: Identificação protéica por impressão digital de peptídeos (PMF).....	11
Figura 7. Representação do processo de ionização por ESI.....	13
Figura 8. Comparação do envelope celular de bactérias gram-negativas e micoplasmas	18
Figura 9. Produção mundial de carne de frango no ano de 2009	24
Figura 10. Exportação mundial de carne de frango no ano de 2009	25
Figura 11. Estados brasileiros exportadores de carne de frango em 2008	26
Figura 12. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel de <i>M. synoviae</i>	39
Figura 13. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em CHAPS de <i>M. synoviae</i>	40
Figura 14. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel de <i>M. synoviae</i>	41
Figura 15. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em SDS de <i>M. synoviae</i>	42

Figura 16. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel de <i>M. synoviae</i>	43
Figura 17. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em CHAPS de <i>M. synoviae</i>	44
Figura 18. Proteínas do <i>M. synoviae</i> identificadas em múltiplas bandas.	47
Figura 19. Classificação funcional das proteínas identificadas no proteoma do <i>M. synoviae</i>	63
Figura 20. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em CHAPS de <i>M. synoviae</i>	71
Figura 21. Identificação das proteínas imunogênicas da fração protéica solúvel em CHAPS de <i>M. synoviae</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil dos géis bidimensionais.....	38
Tabela 2. Proteínas identificadas da fração solúvel de <i>M. synoviae</i> (pH 3-10, 7 cm)	48
Tabela 3. Proteínas identificadas da fração solúvel em CHAPS de <i>M. synoviae</i> (pH 3-10, 7 cm)	50
Tabela 4. Proteínas identificadas da fração solúvel de <i>M. synoviae</i> (pH 4-7, 7 cm)	54
Tabela 5. Proteínas identificadas da fração solúvel em SDS de <i>M. synoviae</i> (pH 3-10, 7 e 13 cm)	56
Tabela 6. Proteínas identificadas da fração solúvel de <i>M. synoviae</i> (pH 3-10, 13 cm)	57
Tabela 7. Proteínas identificadas da fração solúvel em CHAPS de <i>M. synoviae</i> (pH 3-10, 13 cm)	59
Tabela 8. Distribuição das proteínas do <i>M. synoviae</i> e as identificadas em sua categoria funcional COG.....	64
Tabela 9 Proteínas do <i>M. synoviae</i> que reagiram em <i>immunoblot</i> de soro de animais infectados identificadas por MS	73

LISTA DE ABREVIACÕES

2DE	Eletroforese bidimensional
ABEF	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos
ACN	Acetonitrila
ACP	<i>Acyl carrier protein phosphodiesterase</i> /Fosfodiesterase carregadora do grupo acil
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> /Soro albumina bovina
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> /Azul de Coomassie
CDS	<i>Coding DNA sequence</i> /Sequência codificadora de DNA
CHAPS	3-[(3-colomidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups of proteins</i>
CRD	<i>Chronic Respiratory Disease</i> /Doença respiratória crônica
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EF-Tu	<i>Elongation Factor Tu</i> /Fator de alongação Tu
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	<i>Electrospray ionization</i> /Ionização por eletrospray
HI	Hemagglutination inhibition /Inibição por hemaglutinação
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i> /Proteína do choque térmico 70
Hz	Hertz
IAA	Iodoacetamida
IEF	<i>Isoelectric focusing</i> /Focalização isoeétrica
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucinas
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i> /Gradiente de pH imobilizado
kDa	Quilodalton
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> /Ionização/desorção por laser assistida por matriz

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mb	Megabase
MS	<i>Mass spectrometry</i> /Espectrometria de massa
Mw	<i>Molecular weight</i> /Massa molecular
NBT	Cloreto de p-nitro azul de tetrazólio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> /Janela de leitura aberta
P	Fósforo
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> /Tampão fosfato-salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em cadeia da DNA-polimerase
PDHB	Componente E1 da piruvato desidrogenase, subunidade beta
pI	Ponto isoelétrico
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i> /Impressão digital de peptídeos
PMSF	<i>Phenyl methyl sulphonyl fluoride</i> /Fluoreto de fenil metil sulfonil
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PVDF	<i>PolyVinylidene Difluoride</i> /Fluoreto de polivinilideno
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossômico
RNA _t	Ácido ribonucléico transportador
SAR	Soroaglutinação rápida
SDS	<i>Sodium DodecylSulphate</i> /Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium DodecylSulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> /Eletroforese em gel de poliacrilamida usando dodecil sulfato de sódio
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> /Livre do patógeno específico
SSB	<i>Single stranded binding protein</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> /Ácido trifluoroacético
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> /Fator de necrose tumoral
TOF	<i>Time-of-flight</i> /Tempo de voo
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano
V	Voltagem
Vh	Voltagem-hora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Proteômica.....	1
1.1.1 Eletroforese Bidimensional.....	5
1.1.2 Espectrometria de Massa.....	7
1.1.3 Ionização/Dessorção por Laser Assistida por uma Matriz – MALDI.....	9
1.1.4 Ionização por <i>Electrospray</i> -ESI.....	12
1.2 Proteômica de Procariotos.....	14
1.3 <i>Mycoplasma</i>	15
1.4 <i>Mycoplasma synoviae</i>	19
1.5 Avicultura.....	23
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 <i>Mycoplasma</i> : Linhagem, Cultivo e Preparação da Amostra.....	29
3.2 Eletroforese Bidimensional.....	30
3.3 Obtenção e Análise das Imagens.....	32
3.4 Digestão <i>in-gel</i> das Proteínas.....	32
3.5 Espectrometria de Massa.....	33
3.6 Identificação das Proteínas.....	34
3.7 Sensibilização dos Animais.....	34
3.8 Análise de Proteínas Imunogênicas.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Perfil de Extração das Proteínas.....	36
4.2 Perfil dos Géis Bidimensionais.....	37
4.3 Proteínas de <i>Mycoplasma synoviae</i> Identificadas.....	44
4.4 Perfil do Proteoma do <i>Mycoplasma synoviae</i>	62
4.4.1 Armazenamento e Processamento da Informação.....	64
4.4.2 Processos Celulares e Sinalização.....	65
4.4.3 Metabolismo.....	66
4.4.4 Proteínas Pouco Caracterizadas.....	68
4.5 Proteínas Imunogênicas.....	70
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
6. PERSPECTIVAS.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteômica

Na década de 90 houve grande avanço nos projetos genômicos, em virtude da automação dos métodos de análise de ácidos nucleicos, fator decisivo que proporcionou a análise em larga escala do genoma de diversos organismos. Entretanto, o estudo do conteúdo protéico não pôde acompanhar este crescimento na mesma escala. Através do estudo genômico foi possível demonstrar que a complexidade protéica é maior que a gênica, e desta forma, começaram-se as buscas por estratégias de análises do conteúdo protéico total de um organismo (WILKINS et al., 1996; AEBERSOLD, 2003). Segundo Camacho-Carvajal e colaboradores (2004), a era pós-genômica exige uma grande necessidade de desenvolvimento de tecnologias que permitam a análise de complexos protéicos.

O termo “proteoma” foi cunhado em 1993 por Marc Wilkin para descrever todas as proteínas expressas pelo genoma. Porém, uma definição alternativa foi proposta, sendo então, todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em certo momento (PLEBANI, 2005). Desde que o termo foi proposto o campo de estudo da proteômica vem crescendo rapidamente (YANAGIDA, 2002).

O proteoma é o complemento protéico do genoma, e consiste em todas as proteínas expressas em certo momento (WILKINS et al., 1996). Em contraste ao genoma, o proteoma muda constantemente de acordo com os fatores que influenciam a síntese e degradação protéica. Enquanto o genoma contém a informação dos genes, o proteoma informa quais genes estão sendo expressos em um determinado momento (HOLLUNG et al., 2007).

Neste sentido, Cahill e colaboradores (2001) complementam que, contrariamente ao genoma que funciona como repositório estático da informação genética e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo de variáveis como estágio do ciclo de crescimento, disponibilidade de nutrientes, temperatura, resposta ao estresse, condições patológicas e diferenças entre estirpes.

O sequenciamento do genoma tem sido prioridade da pesquisa em biologia molecular nos últimos anos. Já são conhecidos mais de 90 genomas bacterianos e existem 125 em progresso (MATTE et al., 2003). A quantidade de informação disponível em bancos de dados é

praticamente duplicada a cada 12 meses. Entretanto, essa imensa quantidade de informação por si só revela muito pouco a respeito de como as proteínas operam nos organismos (CHAVES, 2004).

Assim, após a sequência completa do genoma de um organismo ter sido determinada, janelas de leitura abertas ou ORFs (*Open Reading Frames*) podem ser preditas, identificando todas as prováveis proteínas codificadas (CASH, 1998). Desta forma, Santos e colaboradores (2004) complementam:

A obtenção da sequência de nucleotídeos do genoma de um organismo, por si só, constitui apenas um primeiro passo que, no entanto, abre caminho à realização de muitos outros estudos. De fato, através da inspeção da sequência do genoma não é possível obter informação sobre o nível de expressão de genes e proteínas, ou sobre características das proteínas expressas, tais como o seu tempo de $\frac{1}{2}$ vida, a sua localização subcelular, eventuais modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e proteína - DNA, a estrutura e a função biológica das proteínas (p. 7).

Assim sendo, a caracterização de um proteoma é apenas o primeiro passo. A combinação da tecnologia proteômica com genética, biologia molecular, bioquímica de proteínas e biofísica tem resultado em rápidas descobertas no campo das funções protéicas (WASHBURN e YATES, 2000).

Para entender a função da célula ou do organismo se requer uma análise detalhada do seu genoma, bem como do seu proteoma. Porém, a análise das mudanças no proteoma é uma tarefa muito mais difícil, pela complexidade química e propriedades das proteínas comparadas com as do DNA. A análise proteômica requer que centenas ou milhares de proteínas sejam analisadas simultaneamente (KERY et al., 2003).

Portanto, a complexidade do proteoma não é devida apenas ao número de genes, mas também às diferentes formas em que são originadas as proteínas, como consequência de *splicing* alternativo e de uma variedade das modificações pós-traducionais (RAMOS et al., 2008). Neste contexto, Cahill e colaboradores (2001) comentam que as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação, e clivagem proteolítica entre outras.

E por esse motivo, a estrutura final e função das diversas proteínas não podem ser definidas apenas pela sequência do genoma.

O termo proteômica se refere às tecnologias utilizadas para a análise do proteoma. Nas últimas três décadas houve significativo avanço nos métodos, devido às necessidades de compreender as funções do genoma. Porém, enquanto as técnicas de análise de genomas estão em grande desenvolvimento, às técnicas para análise proteômica ainda precisam de mais refinamento e desenvolvimento. A maioria das técnicas utilizadas em proteômica é baseada na separação de proteínas usando duas dimensões, através de métodos cromatográficos ou eletroforese, e usualmente seguida de espectrometria de massa (HOLLUNG et al., 2007) (Figura 1).

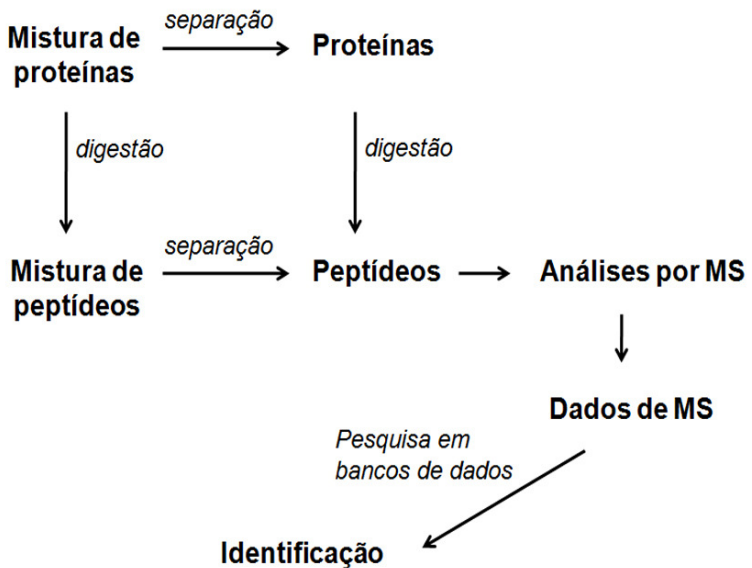


Figura 1. Esquema geral do fluxo da análise proteômica (adaptado de LIEBLER, 2002).

Desta forma, a análise proteômica tem sido uma poderosa tecnologia para identificar proteínas em misturas complexas, e é o método apropriado para o estudo de alterações no perfil de expressão protéica de um organismo em determinadas condições (CHU et al., 2000).

Segundo Plebani (2005), a aplicação da proteômica ocorre basicamente do seguinte modo: *exploração protéica*, identificando a maioria dos componentes do proteoma; *perfil de expressão protéica*, identificando proteínas em duas séries de amostras para analisar o perfil de expressão entre elas; *mapa da rede de proteínas*, para determinar como as proteínas interagem, buscando sua função na interligação entre elas; e *mapa das modificações protéicas*, identificando como e onde ocorrem as modificações pós-traducionais. Ainda neste contexto:

O estudo da proteômica em questão pode levar a três vertentes básicas, com implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia: (1) permite a descoberta de vias metabólicas nas diferentes etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; (2) permite viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; e (3) permite também a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas e exógenas específicas de um determinado estado patológico (ROCHA et al., 2005, p. 2).

Portanto, tradicionalmente três tipos de proteômica têm sido descritos: *Proteômica da expressão protéica*, sendo o estudo quantitativo da expressão protéica para a identificação de novas proteínas; *Proteômica estrutural*, que tem por objetivo traçar a estrutura de complexos protéicos e localização subcelular de proteínas ou organelas; *Proteômica funcional*, que tem por objetivo estudar o perfil protéico para entender a função celular da proteína no organismo a nível molecular (ANDY et al., 2003).

Segundo Graves e Haystead (2002), o objetivo da proteômica não é somente identificar todas as proteínas de uma célula, mas, além disso, criar um completo mapa tridimensional da célula, indicando a localização das proteínas.

Deste modo, o contexto da proteômica vai além da biologia estrutural, a sua missão é caracterizar o comportamento de um sistema, não de um componente em particular (PLEBANI, 2005).

Normalmente, a metodologia mais utilizada na separação das proteínas é realizada através da técnica de eletroforese bidimensional e identificação por meio de espectrometria de massa e modernos *softwares* (JOCELYN e ILAG, 2002; TERENCEZI et al., 1998). A escolha do método de extração é determinante para as proteínas a serem estudadas, pois proteínas que não forem extraídas não serão analisadas. Proteínas muito hidrofóbicas, proteínas de membrana e de alta massa molecular são difíceis de solubilizar e analisar por eletroforese bidimensional (GÖRG et al., 2004). De acordo com Cantú (2007), apesar dos recentes avanços tecnológicos em técnicas alternativas e complementares, como a eletroforese multidimensional acoplada à espectrometria de massa, a eletroforese bidimensional é rotineiramente aplicada na separação de misturas protéicas complexas.

1.1.1 Eletroforese Bidimensional

A Eletroforese bidimensional (2DE) foi inicialmente desenvolvida por O'Farrel e Klose em 1975. A metodologia consistia na eletroforese em géis de poliacrilamida realizada em tubos de ensaio, em que um gradiente de pH era estabelecido com anfólitos específicos, com alta capacidade tamponante. Apesar de engenhosa, a metodologia era trabalhosa e difícil de ser reproduzida (ROCHA et al., 2005). No entanto, o melhoramento da técnica aconteceu com a introdução do gradiente de pH imobilizado em 1988 e atualizado em 2000 no qual os anfólitos são co-polimerizados com a acrilamida, possibilitando o aumento da reprodutibilidade, resolução e separação de proteínas ácidas e básicas (GÖRG et al., 2004). Apesar das recentes tecnologias complementares que surgiram, a eletroforese bidimensional com gradiente de pH imobilizado combinada com a espectrometria de massa é a técnica rotineiramente utilizada em estudos proteômicos (GÖRG et al., 2004).

Através da eletroforese bidimensional as proteínas são separadas com base em duas propriedades das mesmas. Na primeira dimensão, a separação é de acordo com seu ponto isoelétrico (*pI*). As proteínas são moléculas anfóteras, ou seja, elas apresentam carga líquida positiva, negativa ou nula, dependendo da composição de aminoácidos da sua estrutura primária e do pH do meio. Na segunda dimensão, a separação é de acordo com sua massa molecular (*Mw*). Portanto, a

eletroforese bidimensional consiste na combinação de duas técnicas, a focalização isoeétrica (IEF), seguida de SDS-PAGE (SANTOS et al., 2004; LEFKOVITS, 2003) (Figura 2).

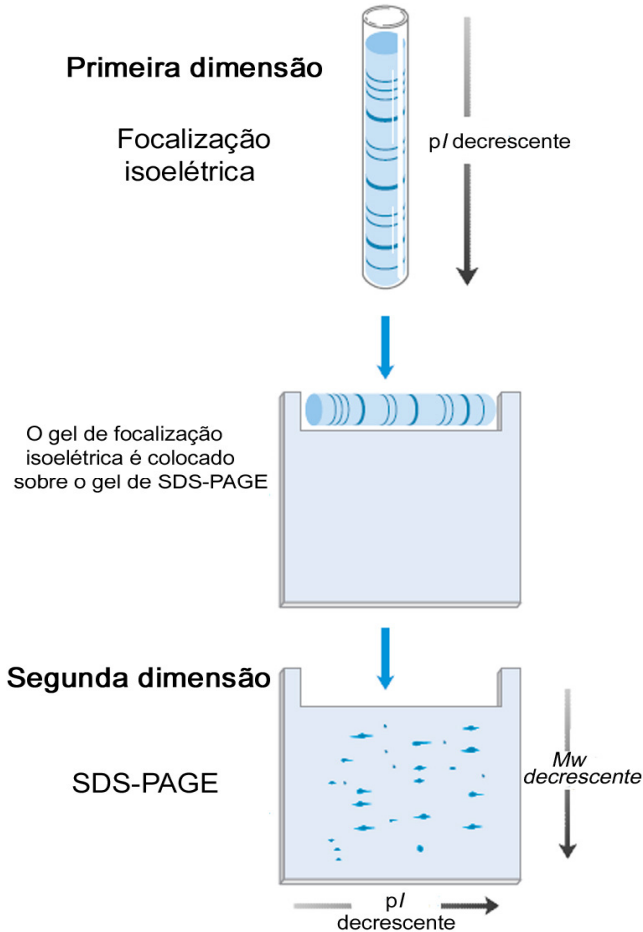


Figura 2. Representação esquemática da eletroforese bidimensional. Primeira dimensão: as proteínas são separadas pela focalização isoeétrica, de acordo com seu ponto isoelétrico em tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG). Segunda dimensão: A tira de IPG é fixada horizontalmente em um gel SDS-PAGE e as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular (adaptado de NELSON e COX, 2004).

A eletroforese bidimensional é considerada uma metodologia de separação protéica eficiente, visto que a maioria das proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente fornecendo informações sobre o ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração na mobilidade eletroforética (PANDEY e MANN, 2000). Segundo GÖRG e colaboradores (2004), dependendo do tamanho do gel SDS-PAGE e do gradiente de pH utilizado a eletroforese bidimensional pode resolver aproximadamente 2000 proteínas e detectar menos de 1 ng de proteínas por banda. A principal aplicação da 2-DE é na análise do perfil de expressão protéico total, entretanto, a partir dessa análise, a expressão protéica diferencial de duas amostras pode ser qualitativa e quantitativamente comparada por meio da 2-DE, identificando assim proteínas com alterações ao nível de abundância relativa em determinada condição (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). Segundo Graves e Haystead (2002), uma aplicação importante da eletroforese bidimensional é a capacidade de resolver proteínas que sofreram modificações pós-traducionais. Essa resolução é possível porque muitos tipos de modificações provocam mudanças na carga e na massa protéica. Nesse caso, pode-se detectar múltiplas bandas de uma mesma proteína, formas diferentes de proteínas que surgiram a partir do processamento do RNA ou por processo proteolítico.

Devido a sua capacidade de resolver diversas proteínas em uma análise, a eletroforese bidimensional continua sendo utilizada na catalogação de proteínas (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). Apesar das limitações da técnica de 2-DE serem bem conhecidas, tais como a dificuldade de solubilização de proteínas de membrana e a dificuldade de visualização de proteínas pouco abundantes, a 2-DE continua sendo no momento uma metodologia poderosa e versátil (LÓPEZ, 2007).

1.1.2 Espectrometria de Massa

Atualmente a maioria dos dados proteômicos tem sido gerada através da espectrometria de massa. Essa técnica tem tornado a identificação de proteínas mais acessível e mais informativa por causa da possibilidade de fornecer a identificação das proteínas resolvidas pela eletroforese bidimensional e ainda caracterizar modificações pós-traducionais (CHOE et al., 2006). Também permite um alto grau de precisão e sensibilidade para determinar a massa molecular de biomoléculas (GRAHAM et al., 2007). A importância da espectrometria de massa no contexto proteômico foi reconhecida em 2002 com o

prêmio Nobel de Química aos pesquisadores que realizaram os primeiros estudos de biomoléculas por espectrometria de massa através do MS-MALDI (SUCKAU et al., 2003).

A partir da década de 80 foram introduzidas duas técnicas de espectrometria de massa para a análise de biomoléculas através de ionização suave, a ionização por *electrospray* (ESI - *Electrospray ionization*) e Ionização/Dessorção por laser assistido por uma matriz (MALDI - *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*). Atualmente ambas as tecnologias são amplamente utilizadas na identificação e caracterização de proteínas e peptídeos (GYGI e AEBERSOLD, 2000; REINDERS et al., 2004). Segundo Graves e Haystead (2002), em ambos os métodos os peptídeos são convertidos em íons pela adição ou perda de um ou mais prótons. MALDI e ESI são métodos de ionização suave, pois permitem a formação do íon sem significativa perda da integridade da amostra.

A espectrometria de massa determina a massa molecular através da relação carga/massa (m/z) de íons gerados a partir da molécula ionizada em fase gasosa. Basicamente um espectrômetro de massa é constituído por uma fonte de ionização, um analisador e um sistema de detecção de íons (Figura 3). Outros avanços relevantes a espectrometria de massa foram a combinação dos ionizadores ESI e MALDI com diversos tipos de analisadores e a conjugação de analisadores de massa em sequência (MS/MS). Tais combinações aumentaram a resolução e sensibilidade da técnica (REINDERS et al., 2004).

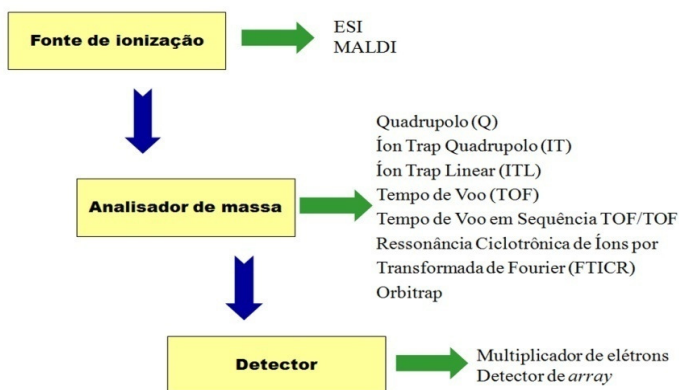


Figura 3: Representação esquemática dos três principais componentes de um espectrômetro de massa para análise proteômica (adaptado de GRAHAM et al., 2007).

1.1.3 Ionização/Dessorção por laser assistida por uma matriz - MALDI

Em 1988, Hillenkamp e colaboradores descobriram que íons de proteínas podem ser produzidos por dessorção a laser, com pouca fragmentação, quando as biomoléculas eram homogeneizadas com pequenos compostos orgânicos, que agem com uma matriz com forte absorção em um feixe de luz (CHEN, 2008). Na ionização por MALDI, a amostra é co-cristalizada com uma matriz orgânica, sendo esta utilizada como um diluente para evitar agregados da amostra. A matriz, geralmente o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, contém um grupo cromóforo que absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta, o que facilita a dessorção e ionização da amostra. As moléculas de matriz e das amostras são vaporizadas devido à absorção de fótons do laser. Neste estágio as moléculas de matriz são excitadas e as moléculas da amostra são ionizadas, então ocorre a dessorção. Somente íons monoprotoneados são gerados (GRAHAM et al., 2007). O esquema de ionização é demonstrado na Figura 4.

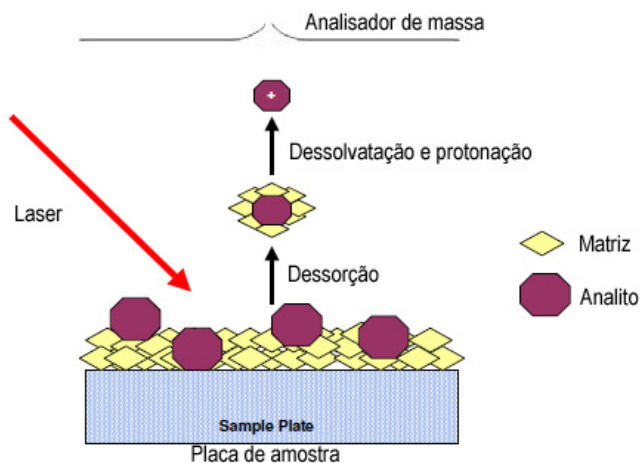


Figura 4: Representação do processo de ionização por MALDI (adaptado de GRAHAM et al., 2007).

O espectrômetro de massa MALDI é geralmente acoplado a um analisador TOF (*time-of-flight*) que mede a massa de peptídeos intactos. Recentemente, para permitir a fragmentação dos íons gerados pelo

MALDI, esse ionizador foi acoplado a um íon trap quadrupolo e dois TOF conjugados em série. Íons com uma razão massa/carga (m/z) particular são selecionados no primeiro analisador, fragmentados em uma célula de colisão e os fragmentos de íons são lidos pelo segundo analisador. Assim esses instrumentos possuem alta sensibilidade, resolução e precisão de massa (AEBERSOLD e MANN, 2003). O esquema de analisadores TOF/TOF é demonstrado na Figura 5.

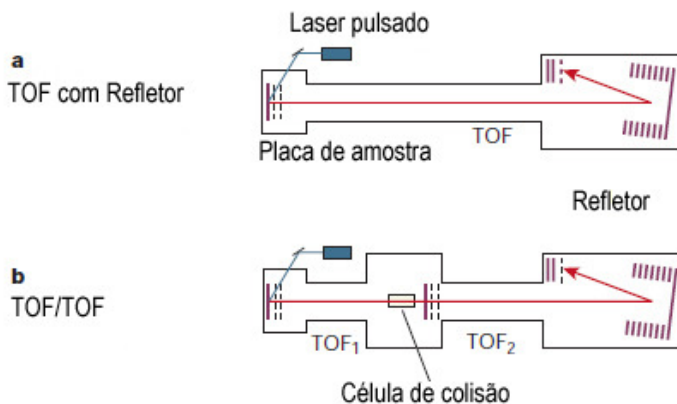


Figura 5: Analisador TOF. (A) No analisador tempo de voo (TOF) os íons são acelerados por uma alta energia cinética e separados ao longo de um tubo de voo, devido a suas diferentes velocidades. Os íons giram em torno de um refletor, em seguida colidem com um detector que amplifica e conta os íons que chegam. (B) O sistema TOF/TOF incorpora uma célula de colisão entre os dois analisadores. Os íons são selecionados no primeiro TOF, fragmentados na célula de colisão e as massas dos fragmentos são separadas no segundo TOF (adaptado de AEBERSOLD e MANN, 2003).

Devido a sua simplicidade, precisão, alta resolução e sensibilidade, o MALDI acoplado a analisador TOF ainda é muito utilizado na identificação da impressão digital de peptídeos (*PMF-peptide mass fingerprint*), de proteínas e outras moléculas. Segundo Suckau e colaboradores (2003), o PMF é usado para comparar a sequência da proteína em bancos de dados, buscando sua identificação. Neste método, as proteínas são identificadas comparando a lista de massas dos peptídeos gerados experimentalmente com a lista de todas as massas de peptídeos de cada registro no banco de dados (AEBERSOLD e MANN, 2003) (Figura 6). Segundo Suckau e colaboradores (2003), o

sucesso da identificação protéica por PMF depende do tamanho do banco de dados e da sua taxa de erro, do número de peptídeos encontrados e de suas massas, da precisão da massa e do controle sobre a digestão química. Sendo que o sucesso da identificação aumenta com o número de peptídeos encontrados e diminui com o aumento da tolerância de massa e a heterogeneidade química. Portanto, muitas vezes o PMF não fornece dados suficientes para a identificação de proteínas. Para contornar esse problema de falta de informação, os íons gerados podem ser analisados por dois ou mais analisadores em sequência (MS/MS).

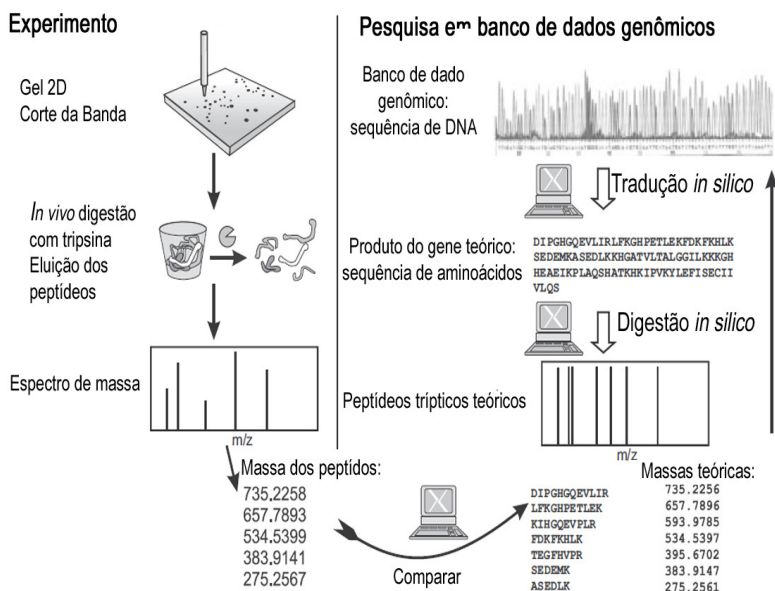


Figura 6: Identificação protéica por impressão digital de peptídeos (PMF). As massas dos peptídeos, de uma proteína digerida, são comparadas com uma lista de massas teóricas de peptídeos, que são derivadas de ORFs do banco de dados do genoma de um organismo (adaptado de Westermeier e Naven, 2002).

De acordo com Chen (2008), as maiores vantagens do MALDI/TOF são a análise rápida sem limitação de faixa de massas; obtenção de espectros de massas simples que facilitam a análise; a imagem molecular; e a alta sensibilidade de detecção. As desvantagens são a baixa reprodutibilidade devido ao processo de cristalização e à fluência do laser; a baixa resolução de proteínas grandes; e a dificuldades na identificação de peptídeos pequenos devido à interferência de íons gerados pela matriz. No entanto, a espectrometria de massa MALDI/TOF continua sendo uma das tecnologias mais utilizadas no estudo de proteínas.

1.1.4 Ionização por *electrospray* - ESI

A ionização por *electrospray* foi desenvolvida por Fenn e colaboradores no final da década de 80, utilizando uma descarga elétrica na ionização de biomoléculas, sendo essa metodologia amplamente utilizada em análises proteômicas (CHEN, 2008). Normalmente em aplicações proteômicas, a ionização por *electrospray* é realizada em conjunto com a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (GRAHAM et al., 2007).

Na ionização por *electrospray* os íons são produzidos à pressão atmosférica, a amostra é dissolvida em uma solução volátil levemente ácida ou básica, e então bombeada através de um fino capilar metálico, ao qual é aplicado um campo elétrico. Forma-se um aerossol de gotículas carregadas, logo ocorre a evaporação do solvente e originam-se íons com múltiplas cargas. Em seguida, os íons são submetidos a alto vácuo e acelerados em um campo elétrico para o analisador de massas (WESTERMEIER e NAVEN, 2002). Um esquema geral da ionização por *electrospray* é apresentado na Figura 7. Para determinar a massa molecular da amostra um simples algoritmo transforma a série de íons em um valor de massa molecular (GRAHAM et al., 2007).

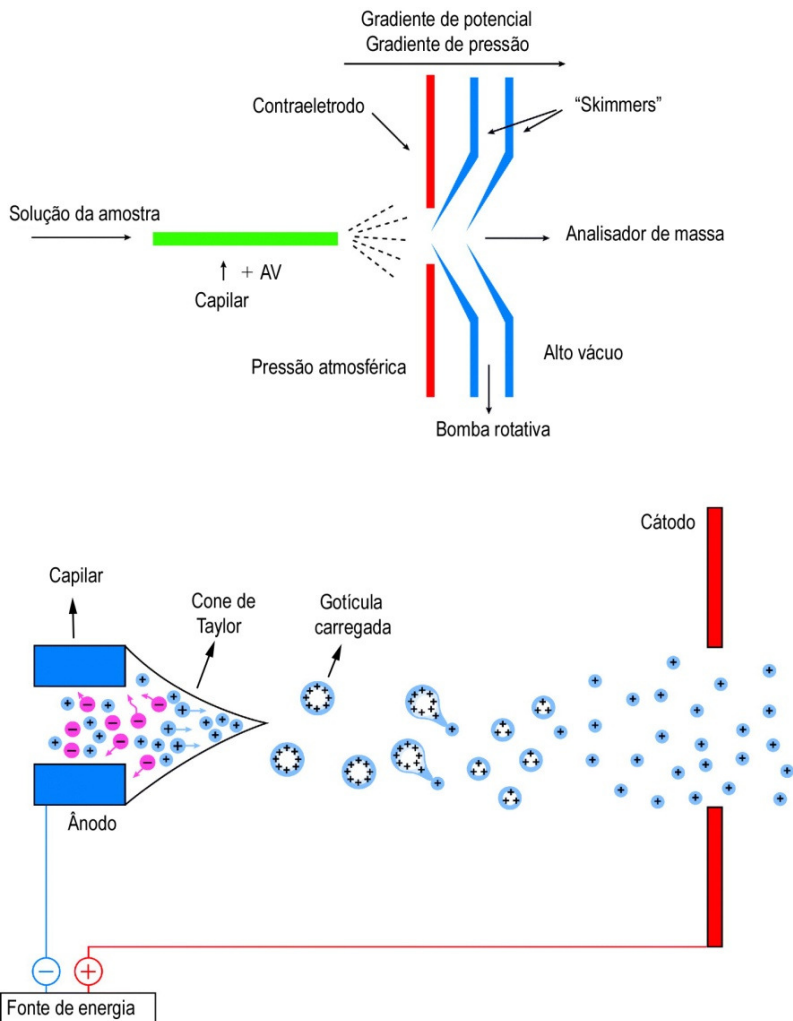


Figura 7: Representação do processo de ionização por ESI (adaptado de GRIFFITHS et al., 2001). A figura inferior representa a ampliação do processo de formação do aerosol com gotículas carregadas, indicado na figura superior pelas linhas pontilhadas.

De acordo com Chen (2008), as maiores vantagens do ESI são a alta reprodutibilidade e a alta flexibilidade para acompanhar diferentes tipos de analisadores. As desvantagens são a complexidade dos

espectros gerados, devido aos picos de íons com múltiplas cargas; a grande quantidade de amostras; e não pode ser usado para imagens moleculares.

As associações mais utilizadas de analisadores e a ionização por electrospray são ESI- íon trap, ESI triplo quadrupolos e ESI quadrupolo/TOF (REINDERS et al., 2004).

Por serem técnicas de ionização muito suaves a ionização por *electrospray* e a nano ESI possibilitam a produção de complexos macromoleculares em fase gasosa mantendo intactas as ligações não-covalentes. Ambas as técnicas de ionização são preferencialmente utilizadas em estudos de interação proteína-proteína, proteína-ligante e proteína-DNA por espectrometria de massa (BICH e ZENOBI, 2009).

1.2 Proteômica de procariotos

A proteômica vem apresentando grande impacto em estudos microbiológicos, principalmente na investigação de agentes patológicos (CASH, 2009). Segundo Washburn e Yates (2000), o surgimento de resistência a antibióticos em diversos patógenos provoca a necessidade de novas pesquisas em busca do conhecimento dos mecanismos de patogenicidade. Desta forma, a proteômica tem facilitado a caracterização de mudanças em um organismo que sejam responsáveis pela patogenicidade, a resistência a antibióticos e a resposta imune.

A proteômica, em particular a eletroforese bidimensional, vem sendo utilizada em estudos do proteoma bacteriano desde o final da década de 70, entretanto, foi a partir de 1995 que surgiu uma nova era no estudo da dinâmica do comportamento do proteoma bacteriano, devido ao sequenciamento do primeiro genoma bacteriano, *Haemophilus influenzae* RD KW20, por Fleischmann e colaboradores em 1995 (BRÖTZ-OESTERHELT et al., 2005).

De acordo com Brötz-Oesterhelt e colaboradores (2005), as bactérias são um ótimo modelo para o estudo de mecanismos regulatórios, função protéica e diferenciação celular, visto que possuem genomas pequenos, comparados com os eucariotos, e um processo de adaptação de baixa complexidade. Além do que, as bactérias possuem grande importância na área industrial e na biotecnológica, bem como nas áreas médica e veterinária.

Portanto, a análise proteômica de bactérias tem-se tornado muito útil na complementaridade dos dados genômicos, identificação de proteínas, caracterização antigênica, identificação de proteínas diferencialmente expressas, caracterização de modificações pós-

traducionais e identificação de fatores de virulência (PINTO et al., 2007).

1.3 Mycoplasma

Os micoplasmas pertencem à classe Mollicutes, à ordem Mycoplasmatales, à família Mycoplasmataceae e ao gênero *Mycoplasma* (WALKER, 2003). Os microrganismos da classe Mollicutes (*Mycoplasmas*) foram identificados pela primeira vez em 1898, como agentes etiológicos da pleuropneumonia contagiosa bovina (PPCB), assim, esses microrganismos foram denominados de “pleuropneumonia-like-organisms” (PPLO) (DAVIS et al., 1973).

Mycoplasmas são parasitas obrigatórios, considerados os menores procariotos conhecidos com habilidade de auto-replicação (RAZIN et al., 1998). Possuem um genoma muito pequeno, envolvendo a perda de genes não essenciais, incluindo genes de síntese de parede celular, catabolismo e passos metabólicos (BORGES et al., 2007). Devido a essa característica, os *Mycoplasmas* possuem um complexo requerimento nutricional, incluindo requerimento de suplementos externos, de muitos precursores biossintéticos (BASEMAN e TULLY, 1997) como, por exemplo, colesterol e proteínas (RAMÍREZ, 2008).

Segundo Carvalho e colaboradores (2005), o genoma desses microrganismos possui um total de 0,58 a 1,4 Mb, contendo baixa proporção de nucleotídeos guanina/citosina, provavelmente adquirido de um ancestral comum a bactérias gram positivas. Os cromossomos desses organismos são estruturas dinâmicas, ocorrendo frequentemente rearranjos, inserções e deleções, sendo a maioria provocada por recombinação homóloga mediada pela proteína RecA (FONSECA et al., 2007).

Esses organismos são pequenas bactérias que diferem fenotipicamente das demais, pois não possuem parede celular, provocando diversas interações com seus hospedeiros, assim, mantendo um estilo de vida crônico e parasitário. Sua limitada capacidade genética e a falta de proteínas regulatórias conhecidas sugere que outros meios estão envolvidos na adaptação e sobrevivência na mudança de hospedeiros, talvez como uma alternativa para a regulação gênica clássica. *Mycoplasmas* são conhecidos por utilizar uma ampla forma de mecanismos para gerar fenótipos e variações genéticas na sua população. Variações nas proteínas de superfície são conhecidas por ser uma estratégia de sobrevivência dentro do hospedeiro e mediar vários aspectos da patogenicidade (DAVIS e WISE, 2002).

Durante os últimos anos os *Mycoplasmas* têm atraído muito interesse científico devido ao seu reduzido genoma, bem como o número de reguladores gênicos ainda menor (HALBEDEL et al., 2007). Neste sentido, Arraes e colaboradores (2007) complementam relatando que o genoma de nove espécies de *Mycoplasma* foram sequenciados, *Mycoplasma gallisepticum* R (tamanho do genoma 996422 bp), *Mycoplasma genitalium* G-37 (580074 bp), *Mycoplasma hyopneumoniae* 232 (892758 bp) 7448 (920079 bp) e J (897405 bp), *Mycoplasma mobile* 163K (777079 bp), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC linhagem PG1 (1211703 bp), *Mycoplasma penetrans* HF-2 (1358633 bp), *Mycoplasma pneumoniae* M129 (816394 bp), *Mycoplasma pulmonis* UAB CTIP (963879 bp), e *Mycoplasma synoviae* 53 (799476 bp). Recentemente Dybvig e colaboradores (2008) relataram o sequenciamento do genoma do *Mycoplasma arthritis* 158 (820453bp).

Até o presente, o proteoma de seis espécies de *Mycoplasma* foram descritos, *M. pneumoniae* por Regula e colaboradores (2000), *M. genitalium* por Wasinger e colaboradores (2000), *M. penetrans* por Ferrer-Navarro e colaboradores (2006), *M. hyopneumoniae* 7448, J e 232 por Pinto e colaboradores (2007) e Li e colaboradores (2009), *M. gallisepticum* por Demina e colaboradores (2009) e *M. suis* por Congli e colaboradores (2009).

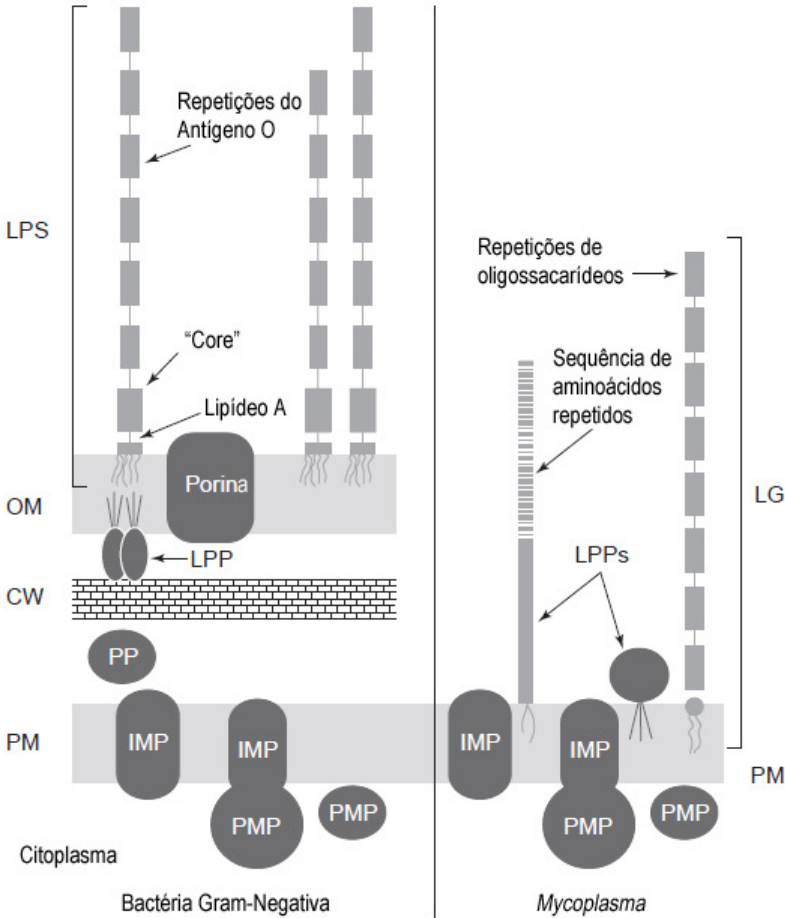
Embora os Mollicutes tenham um genoma simples, as doenças provocadas pelos *Mycoplasmas* são complexas e relativamente desconhecidas (BAILÃO et al., 2007). Com relação ao modo de infecção, os *Mycoplasmas* colonizam o tecido do hospedeiro provocando resposta imune sistêmica e local, algumas vezes causam imunodepressão e doenças autoimunes (RAZIN et al., 1998). Alguns micoplasmas podem viver no meio intracelular, porém a maioria coloniza superfícies extracelulares de mucosas, principalmente a respiratória e urogenital, tanto do homem como de outras espécies (ROCA, 2006).

Apesar da simplicidade estrutural e funcional dos micoplasmas, a interação com a resposta imune do hospedeiro é extremamente complexa, sendo principalmente devido às propriedades da superfície celular destes microrganismos. No envelope celular dos micoplasmas falta uma parede celular e uma membrana externa, que são comuns ao envelope de bactérias gram negativas (Figura 8). Ambos os envelopes contêm lipoproteínas ancoradas, porém nos micoplasmas elas estão ancoradas no lado externo da membrana plasmática, enquanto nas bactérias gram negativas elas estão no lado interno da membrana

externa. A presença de grande quantidade de lipopolissacarídeos na membrana externa é uma característica distintiva de bactérias gram negativas. A membrana plasmática de alguns micoplasmas ao invés de lipopolissacarídeos contém lipoglicanos. Embora distintos dos lipopolissacarídeos, os lipoglicanos também apresentam uma âncora lipídica e uma estrutura de oligossacarídeos. Adicionalmente, os micoplasmas possuem lipoproteínas que são antígenos variáveis, pois sofrem constantes variações (CHAMBAUD et al., 1999).

Segundo KAHANE e RAZIN (1969), os principais determinantes antigênicos dos *Mycoplasmas* estão localizados na membrana. MESSIER e ROSS (1991) evidenciaram que esses microrganismos possuem fatores mitogênicos para linfócitos, os quais seriam responsáveis pela hiperplasia linfóide peribronquiolar característica da doença. Os *Mycoplasmas* são considerados superantígenos (MIMS et al., 1995), capazes de estimular excessivo número de células B e T pela exposição de vários epítomos simultaneamente. Ainda têm a capacidade de escapar das defesas naturais do hospedeiro fixando-se firmemente à sua mucosa respiratória (YAMAMOTO, 1994), podendo sua localização no lúmen explicar a dificuldade de eliminação do agente. Além disso, o *Mycoplasma* tem a habilidade de mimetizar várias superfícies antigênicas e utilizar-se dessa variação para evadir-se do sistema imune (DONE, 1996). Segundo Rottem e Naot (1998), a evasão do sistema imune do hospedeiro é um mecanismo essencial a sobrevivência do micoplasma dentro do hospedeiro.

Existem diversas evidências que sugerem que durante a infecção por micoplasmas as lipoproteínas da superfície celular são o principal alvo da resposta imune. Muitos estudos de *Mycoplasmas* têm demonstrado que as lipoproteínas estimulam monócitos e induzem a secreção de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 6 e 1 (IL-6 e IL-1) (CHAMBAUD et al., 1999). As infecções respiratórias provocadas por micoplasmas também são caracterizadas pelo recrutamento de leucócitos, seguido pela infiltração de macrófagos e linfócitos. Contudo, nem todas as infecções provocadas por micoplasmas são associadas com uma forte resposta inflamatória, alguns micoplasmas colonizam o hospedeiro sem apresentar nenhum sintoma aparente. Neste caso, tem sido demonstrado que lipoproteínas induzem IL-10, uma citocina capaz de modular negativamente a resposta inflamatória (CHAMBAUD et al., 1999).



trends in Microbiology

Figura 8. Comparação do envelope celular de bactérias gram-negativas e micoplasmas. Abreviações: CW - parede celular, IMP – proteína integral de membrana, LG – lipoglicanos, LPP – lipoproteínas, LPS – lipopolissacarídeos, OM – membrana externa, PM – membrana plasmática, PMP – proteína periférica de membrana, PP – proteína periplasmática (adaptado de CHAMBAUD et al., 1999).

Uma etapa essencial na colonização do tecido hospedeiro pelos micoplasmas é a adesão às células epiteliais. A aderência é considerada como um dos maiores fatores de virulência dessas bactérias. A maioria

das espécies possui adesinas que auxiliam no mecanismo de adesão. Uma vez aderida às células hospedeiras interfere com os receptores de membrana ou altera o mecanismo de transporte das mesmas e também torna a célula do hospedeiro vulnerável a metabólitos citotóxicos e a atividade de enzimas citolíticas produzidas pelo patógeno, tais como, espécies reativas de oxigênio e fosfolipases (ROTTEM e NAOT, 1998).

Os micoplasmas são extremamente específicos em relação aos tecidos que invadem no hospedeiro. Em virtude de requerimentos nutricionais e como consequência direta do tamanho de seu genoma estabelecem uma complementariedade metabólica com o hospedeiro (VASCONCELOS et al., 2005) e são mais susceptíveis a mutações do que outras bactérias (GONÇALVES et al., 2005).

De acordo com Rottem e Naot (1998), a competição por nutrientes ou precursores biossintéticos pelos micoplasmas pode alterar a integridade e função da célula hospedeira. Um dos efeitos mais conhecidos é resultado da competição pela arginina por micoplasmas que não realizam fermentação e utilizam a arginina dihidrolase na geração de ATP, rapidamente reduzindo a reserva do hospedeiro, alterando a síntese protéica, a divisão celular e o crescimento. Outros mecanismos estão envolvidos na competição por precursores de ácidos nucleicos ou degradação do DNA da célula hospedeira por nucleases do micoplasma.

Dentre as mais de 190 espécies já descritas, várias têm importância médica ou veterinária, e são parasitas obrigatórias de humanos, plantas e animais (RAZIN et al., 1998). Portanto, a infecção por *Mycoplasmas* em animais causa várias doenças que são associadas a significativas perdas econômicas (KUSILUKA et al., 2007). Alguns destes microrganismos têm predileção pelas membranas mucosas e serosas dos tratos respiratório e reprodutivo das aves, causando problemas respiratórios, articulares e urogenitais (NASCIMENTO, 2000).

1.4 *Mycoplasma synoviae*

Os micoplasmas são importantes patógenos de aves responsáveis por doenças respiratórias crônicas (CRD) e infecciosas, como sinovite e bursite em frangos e perus (BUIM et al., 2009). Segundo Dusanic e colaboradores (2009) das 12 espécies de micoplasmas que infectam frangos e perus, o *M. gallisepticum* e o *M. synoviae* são as mais patogênicas. Entretanto, o fator responsável por esta virulência em ambas as espécies é pouco caracterizado.

Mycoplasma synoviae é um dos maiores patógenos de aves domésticas em todo o mundo, sendo responsável por infecções subclínicas no trato respiratório superior, mas pode também causar aerossaculite, isto é, inflamação das mucosas dos sacos aéreos das aves, e sinovites em frangos e perus (BORGES et al., 2007). As micoplasmoses em aves foram descritas pela primeira vez em perus em 1926, e frangos em 1936. A sinovite causada por *M. synoviae* foi descrita desde então, e o primeiro relato de infecção causando artrite foi em meados da década de 50. Porém, só na década de 70 que doenças respiratórias provocadas por *M. synoviae* foram descritas (NASCIMENTO et al., 2005).

A infecção pelo *M. synoviae* está presente na criação de frangos em todo o mundo, inclusive em países com alto nível de desenvolvimento em medidas de biossegurança. Apesar da forte resposta do sistema imune dos frangos, a colonização bacteriana persiste e se torna crônica. No entanto, os fatores que contribuem à forma crônica são pouco conhecidos, mas as proteínas de membrana imunodominantes associadas à aderência podem em parte ser responsáveis por esta característica (BENCINA et al., 1999). De acordo com Fonseca e colaboradores (2007), a principal característica nos micoplasmas que permite estabelecer uma infecção crônica é a alta flexibilidade do seu genoma.

Devido à ausência de parede celular, as lipoproteínas de membrana desempenham grande importância na interação entre o *M. synoviae* e o hospedeiro. A principal lipoproteína imunogênica em *M. synoviae* é a hemaglutinina Vlha. A proteína Vlha é clivada gerando dois fragmentos, as proteínas MSPB e MSPA, sendo estas altamente imunogênicas e indutoras da resposta imune sistêmica e local na fase aguda da infecção (LAVRIC et al., 2007). Segundo Bencina e colaboradores (1999) as principais proteínas imunogênicas do *M. synoviae* são a MSPB e a MSPA, ambas são de fase variável e estão envolvidas na adesão do microrganismo ao eritrócito hospedeiro. O genoma do *M. synoviae* contém um único gene que expressa hemaglutininas, o gene *vlhA*, e vários pseudogenes *vlhA*. Estas sequências podem sofrer alta frequência de recombinação gerando um grande número de variantes do gene expresso, desta forma, contribuindo para geração da diversidade antigênica na superfície celular do micoplasma (ALLEN et al., 2005).

Macrófagos expostos ao *M. synoviae* apresentaram indução dos genes de IL-1 β , IL-6, iNOS e de três genes de quimiocinas (LAVRIC et al., 2008). As lipoproteínas de micoplasmas interagem com o receptor

toll-like (TLR) da célula hospedeira. Em frangos, o receptor TLR2, localizado na superfície de macrófagos, tem capacidade de reconhecer lipoproteínas e lipopossacarídeos. A ativação do sinal de transdução do TLR2 provoca a indução da síntese de moléculas imunomodulatórias, como IL-1 β , IL-6 e óxido nítrico (LAVRIC et al., 2007). Esses autores demonstraram que a lipoproteína MSPB, a região N-terminal da hemaglutinina VlhA do *M. synoviae* é capaz de induzir a síntese de IL-1 β , IL-6 e óxido nítrico em macrófagos de frangos.

Além dos mecanismos de infecção característicos do gênero, a latência é uma estratégia de virulência comum a micoplasmas de aves. Durante o estado de latência o micoplasma não é reconhecido pelo sistema imune, provavelmente por sua localização intracelular. Desta forma, podem se manifestar após a infecção por outros agentes patológicos, como bactérias e vírus, enquanto o sistema imune do hospedeiro está debilitado (NASCIMENTO et al., 2005).

Recentemente, Dusanic e colaboradores (2009) evidenciaram que o *M. synoviae* é capaz de invadir eritrócitos, condrócitos e células embrionárias de frangos *in vitro*. Portanto, a localização intracelular do patógeno em três células não fagocíticas contribui na compreensão dos mecanismos de evasão do *M. synoviae* ao sistema imune do hospedeiro e ao tratamento com antibióticos.

Os sintomas e as lesões das infecções por *Mycoplasma* em aves ocorrem primeiramente no trato respiratório, seguido do sistema articular e, com menor frequência, em outras regiões. Dentre as alterações anatomopatológicas macroscópicas encontradas destacam-se sacos aéreos opacos e espessados, inflamações catarrais nas fossas e seios nasais, faringe, traquéia e brônquios. Os sacos aéreos são os locais mais afetados, devido ao processo respiratório das aves, onde o ar inspirado passa primeiro pelos grandes brônquios e sacos aéreos para depois ser liberado aos pulmões (NASCIMENTO, 2000). Quando a infecção pelo *M. synoviae* evolui do trato respiratório superior para uma infecção sistêmica, resulta principalmente em artrites, também conhecida como sinovite. A sinovite é uma doença que evolui de aguda a crônica em frangos e perus, envolvendo primeiramente a infecção da membrana sinovial de juntas e tendões. Algumas das artrites ou formas sistêmicas da infecção por *M. synoviae* assemelham-se a doenças autoimunes, mas o mecanismo imunológico dessa manifestação ainda permanece pouco compreendido (NARAT et al., 1998).

A transmissão do *M. synoviae* em aves ocorre horizontalmente pelo convívio com animais doentes, e verticalmente dos pais a sua prole, pela contaminação dos ovos. As perdas econômicas atribuídas a *M.*

synoviae são devidas à depressão imunológica, diminuição na conversão alimentar, condenação de carcaças, aumento na mortalidade e diminuição na produção de ovos (NASCIMENTO et al., 2005).

O diagnóstico provisório e o monitoramento da infecção por *M. synoviae* é normalmente realizado por testes sorológicos, enquanto o diagnóstico definitivo é realizado através da isolamento e identificação do organismo. Recentemente vem sendo empregado o uso de PCR para a rápida detecção e identificação do *M. synoviae* em amostras clínicas (JEFFERY et al., 2007). Os primeiros testes através de PCR utilizados na detecção do *M. synoviae* foram baseados no gene *16S RNAr*, seguido por PCRs que identificam o gene *23S RNAr* ou o gene da hemaglutinina *vlhA* (RAMÍREZ et al., 2006; HAMMOND et al., 2009).

O controle das infecções provocadas por micoplasmas de aves através da vacinação é muito limitado, pois poucas vacinas estão disponíveis no mercado. Atualmente, uma vacina no controle do *M. synoviae* está sendo utilizada em alguns países, a vacina é baseada em uma linhagem sensível à temperatura. Esta linhagem foi produzida através de mutagêneses químicas e mesmo com a perda do fenótipo sensível à temperatura não ocorre à reversão da virulência. Ela foi avaliada como segura e eficaz na imunização em frangos, pois eles não apresentam lesões após a sua administração, evita a transmissão lateral do patógeno e o período de proteção dura em torno de 40 semanas (NICHOLAS et al., 2009). Outra forma de controle é baseada no uso de quimioterápicos, os micoplasmas são resistentes aos antibióticos do grupo da penicilina, mas sensíveis ao grupo da tetraciclina, macrolídeos, quinolonas e tiamulinas (NASCIMENTO et al., 2005). No entanto, aumento da resistência dos micoplasmas contra as tetraciclinas, os macrolídeos e as quinolonas tem sido relatado para diversas espécies (GAUTIER-BOUCHARDON et al., 2002).

No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola não recomenda o controle de micoplasmoses por vacinação, e sugere a diminuição do uso de antibióticos, pois não eliminam completamente as infecções. Desta forma, a recomendação em casos de ocorrência de micoplasmoses no rebanho é a erradicação dos animais (BUIM et al., 2009).

A prevalência de *M. synoviae* na produção de aves no Brasil aumentou a partir da década de 80, embora seja uma doença assintomática, causa grandes perdas à indústria avícola (NASCIMENTO et al., 2005). Segundo Cardoso e colaboradores (2006) através da literatura pouco se conhece da prevalência de *M. synoviae* no Brasil. Em uma análise sorológica, com o teste de soroaglutinação rápida (SAR)

para a detecção do *M. gallisepticum* e do *M. synoviae* em frangos de diversas regiões do Brasil, o autor e seus colaboradores constaram a ausência de *M. gallisepticum* nos plantéis de reprodução analisados, mas as amostras de soro testadas frente ao antígeno de *M. synoviae* reagiram positivamente com 1,58% dos animais analisados.

Recentemente, Buim e colaboradores (2009) avaliaram a prevalência de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em diferentes sistemas de produção comercial de frangos em alguns estados brasileiros. Foram analisadas 1046 amostras de traquéias e embriões bicados, de 33 estabelecimentos comerciais pela técnica PCR Multiplex. A prevalência de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* nas granjas foi de 72,7%, com predominância de *M. synoviae* (60,6%) como o único agente infeccioso ou associado com outros micoplasmas. O estudo demonstrou que houve um significativo aumento na incidência de *M. synoviae* e na redução do *M. gallisepticum* nas granjas comerciais do Brasil.

1.5 Avicultura

Nos últimos 30 anos, a avicultura brasileira se tornou um dos mais importantes setores da agroindústria e atingiu altos níveis de produtividade (SILVA et al., 2008). A avicultura possui um dos maiores e mais avançados acervos tecnológicos dentre o setor agropecuário brasileiro, devido ao progresso em genética, nutrição, manejo e sanidade que ocorreram nas últimas décadas, fator que transformou o setor em um verdadeiro complexo econômico (TINÔCO, 2001). Neste contexto, Savaglia (2009) relata que o início da criação de aves no Brasil para fins comerciais ocorreu em meados do século 19 em algumas fazendas no estado de Minas Gerais. Em 1913 foi fundada a Sociedade Brasileira de Avicultura, e, no final da década de 30, a produção interna já era considerada um negócio promissor. Contudo, o início da estruturação da indústria avícola nacional ocorreu após o final da 2^o Guerra Mundial, pois aos poucos os brasileiros começaram a consumir a ave pronta, isto é, abatida e limpa. As exportações começaram a se fortalecer na década de 70, e com isso houve grandes investimentos em tecnologia na produção. Na década de 90 o Brasil se consolidou como um dos maiores produtores de aves do mundo.

Segundo Buim e colaboradores (2009), a avicultura se destaca na econômica nacional pela geração de empregos e a troca externa de créditos da balança comercial. No setor agropecuário, a carne de frango, ocupa a primeira posição nas exportações de carnes brasileira, representando 63,26% (toneladas) das exportações no ano de 2008,

seguida pela carne bovina com 24,01%. Mesmo sob o impacto da crise econômica mundial, que se abateu no mês de outubro de 2008, a produção de carne de frango registrou 4,5% de crescimento, pouco abaixo dos 6,2% registrados em 2007. O Brasil segue em terceiro lugar como produtor de carne de frango, com 10,9 milhões de toneladas de carne e um crescimento de 6,2%. Sendo precedido pela China com 11,9 milhões de toneladas e com 5,4% de crescimento, e os Estados Unidos, com 16,6 milhões de toneladas e crescimento de 2,1% (ABEF, 2009). A Figura 9 representa a participação dos países produtores de carne de frango no mundo.

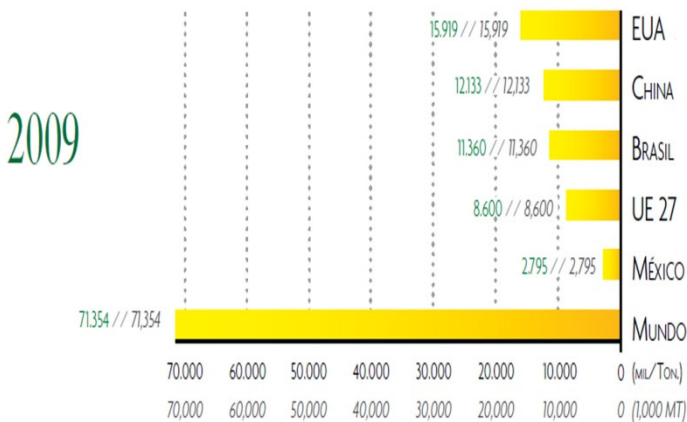


Figura 9. Produção mundial de carne de frango no ano de 2009 (ABEF, 2009), em mil toneladas.

Segundo a ABEF (2009), com relação à exportação de carne de frango, o ano de 2008 totalizou um embarque de 3,6 milhões de toneladas, registrando um crescimento de 10,7% em relação ao ano anterior, e a receita cambial registrou um aumento de 39,7%. Esses números são considerados positivos devido à inesperada crise econômica. Destacam-se a Rússia, o Japão, a União Européia, Hong-Kong e a África do Sul como os principais clientes desse segmento. O Brasil lidera a posição mundial na exportação de carne de frango, seguido pelos Estados Unidos e pela União Européia. No cenário nacional, a região sul se destaca como a maior produtora e exportadora

de carne de frango. O estado do Paraná ocupa a primeira posição no setor de exportação, seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As Figuras 10 e 11 apresentam a participação do Brasil no cenário mundial de exportação de carne de frango e a participação dos estados brasileiros no cenário nacional de exportação de carne de frango, respectivamente.

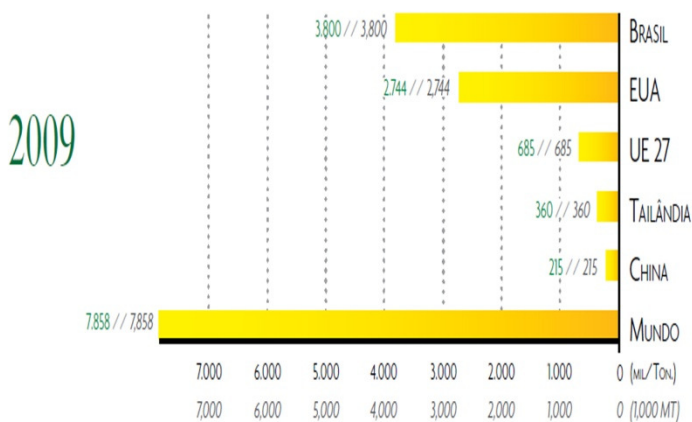


Figura 10. Exportação mundial de carne de frango no ano de 2009 (ABEF, 2009), em mil toneladas.

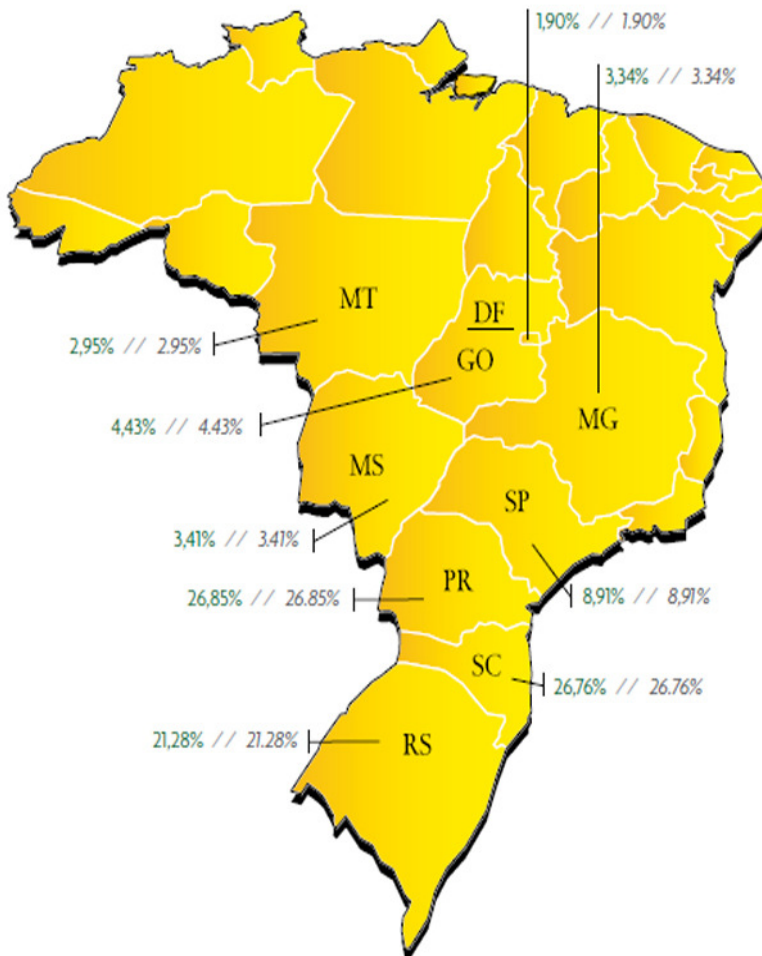


Figura 11. Estados brasileiros exportadores de carne de frango em 2008 (ABEF, 2009). O valor em porcentagem é referente ao total de toneladas de carne de frango exportadas pelos estados brasileiros.

As infecções bacterianas em aves tornaram-se um dos maiores desafios para a indústria avícola mundial, pois ocasionam perda na produtividade, aumento na mortalidade e muitas vezes contaminação dos produtos de origem avícola destinados ao consumo humano (SANTOS e GIL-TURNES, 2005). Atualmente, com a importação mais rigorosa pelo mercado estrangeiro, para garantir a qualidade sanitária da carne produzida pelo Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) conduz o controle e/ou erradicação das micoplasmoses e outras doenças (SILVA et al., 2008). O PNSA determina o monitoramento de micoplasmoses em estabelecimentos avícolas através de provas sorológicas, como soroaglutinação rápida em placa (SAR), HI (inibição por hemaglutinação) e ELISA (LUCIANO et al., 2007).

Segundo Silva e colaboradores (2008), de acordo com a regulamentação brasileira, os criadores de aves devem ser livres de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma meleagridis*. Porém alguns produtores e veterinários acreditam que *M. synoviae* seja inofensivo para as aves domésticas. Essa crença pode ser devido à dificuldade de diagnóstico, à variação da virulência entre as diferentes cepas e as diferentes formas de manifestação da doença. Consequentemente, o controle e a erradicação do *M. synoviae* tem sido negligenciando, permitindo a disseminação do patógeno entre as criações.

Tendo em vista a destacada importância desse organismo, seu genoma foi sequenciado pela organização brasileira do Consórcio Nacional do Projeto Genoma. O mesmo apresentou um tamanho de 799476 pb e um total de 694 CDSs (VASCONCELOS et al., 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a análise proteômica do extrato de proteínas citoplasmáticas de *Mycoplasma synoviae*, patógeno precursor de grande impacto econômico à produção avícola no cenário mundial e principalmente no estado de Santa Catarina. A análise proteômica das proteínas do organismo visa o desenvolvimento de diagnósticos mais eficientes, assim como novas formas terapêuticas contra a doença, sendo assim de interesse direto à economia do Estado.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o protocolo adequado ao fracionamento de proteínas citoplasmáticas de *Mycoplasma synoviae*;
- Análise protéica por meio de eletroforese bidimensional;
- Identificação das proteínas por espectrometria de massa;
- Identificação de alvos protéicos que permitam estratégias terapêuticas e/ou diagnóstico em aves.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Mycoplasma*: linhagem, cultivo e preparação da amostra

As amostras contendo o precipitado celular de *Mycoplasma synoviae* linhagem 53 (ATCC 24204), foram fornecidas pelo Laboratório de Sanidade Animal – Setor de Biotecnologia de Suínos da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC, dirigido pela pesquisadora Catia S. Klein.

O patógeno foi isolado da traquéia de uma galinha matriz de corte procedente de um criadouro do estado do Paraná (FIORENTIN et al., 2003). As células foram incubadas em caldo FREY a 37 °C por 24 horas, então uma alíquota de 0,3 ml foi cultivada em condições anaeróbicas em 3 ml de caldo FREY a 37 °C por 24 horas, após esse período foram realizadas repicagens em volumes crescentes (2 ml em 20 ml de caldo; 20 ml em 200 ml de caldo e 200 ml em 2 L de caldo) até a cultura alcançar a fase exponencial indicada pela mudança de coloração e turbidez. O meio de cultivo foi centrifugado a 1500 x g por 90 minutos a 4 °C e as células foram lavadas com caldo FREY livre de proteínas e centrifugadas a 13400 x g por 20 minutos a 4 °C, e então armazenadas a -20 °C.

Três técnicas de extração protéica foram testadas: extração por lise celular física (PINTO et al., 2007), lise celular física associada ao detergente CHAPS (GÖRG, 2004) e lise celular física associada ao detergente SDS (WISNIEWSKI et al., 2009).

Na primeira técnica de extração, as células precipitadas (aproximadamente 100 mg) foram dispersas em 2,5 ml de tampão de lise contendo 25 mM Tris-HCl, pH 7,2 com inibidor de protease a uma concentração final de 40 µg/ml (PMSF, Sigma[®] Aldrich). A suspensão celular foi lisada por sonicação (Fisher Scientific Model 100 Sonic Dismembrator) em gelo por 6 ciclos de 25 segundos com 1 minuto de intervalo entre os pulsos. Então, o lisado foi centrifugado a 13400 x g por 1 hora a 4 °C para precipitar restos celulares e o sobrenadante resultante contendo as proteínas solúveis de interesse para a análise do presente projeto foi recolhido. Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante, uma concentração final de 8 M uréia, 4% (p/v) CHAPS, 2% (v/v) anfólitos e 40 mM DTT, sendo a solução agitada por 1 hora, para que ocorresse a solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas da amostra. Após esta etapa a amostra foi estocada a -80 °C para uso posterior.

Na segunda técnica de extração, as células precipitadas (aproximadamente 100 mg) foram dispersas em 1 ml de tampão de lise contendo CHAPS (25 mM Tris-HCl, pH 7,2, 7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% (p/v) CHAPS, 2% (v/v) anfólitos e 40 mM DTT) na presença de inibidor de protease a uma concentração final de 40 µg/ml (PMSF, Sigma® Aldrich). A suspensão celular foi lisada por sonicação em gelo por 6 ciclos de 25 segundos com 1 minuto de intervalo entre os pulsos. Então, o lisado foi centrifugado a 13400 x g por 1 hora a 4 °C para precipitar restos celulares e o sobrenadante resultante foi recolhido e estocado a -80 °C para uso posterior.

Na terceira técnica de extração, o precipitado celular (aproximadamente 100 mg) foi disperso em um volume de 1:10 em tampão de lise contendo 4% (p/v) SDS, 100 mM Tris/HCl, pH 7,6 e 0,1 M DTT. A solução foi incubada por 5 minutos a 95 °C e sonicada brevemente em apenas 1 ciclo de 25 segundos, para diminuir a viscosidade provocada pelo DNA. Então o lisado foi centrifugado a 16000 x g por 10 minutos a 20 °C e o sobrenadante foi recolhido e concentrado em um volume de até 200 µl em filtros Microcon YM 10 (Millipore). Para reduzir a concentração do SDS na solução protéica adicionamos à amostra resultante 300 µl de uma solução de 8 M uréia, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, então a amostra foi centrifugada em filtros Microcon YM 10 por 1 hora a 14000 x g a 20 °C. Ao concentrado resultante foram adicionados mais 300 µl da solução anterior, essa etapa foi repetida 3 vezes. Aos 200 µl de amostra resultante foram adicionados 300 µl de uma solução de 0,05 M de IAA em 8 M uréia, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, a amostra foi manualmente agitada por 1 minuto e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. No próximo passo a amostra foi centrifugada a 14000 x g por 1 hora a 20 °C. Nesse etapa, aos 200 µl resultantes foi adicionado 300 µl de uma solução de 8 M uréia, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, e novamente foi concentrada e centrifugada por 1 hora a 14000 x g a 20 °C, essa etapa foi repetida 3 vezes. A cada diluição a concentração do SDS foi calculada baseada no volume de tampão adicionado à amostra até alcançar a concentração de 0,001% SDS, que foi estocada a -80 °C para uso posterior.

3.2 Eletroforese Bidimensional

As proteínas totais obtidas com os três métodos de extração foram quantificadas utilizando o 2-D Quant Kit® (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente à

quantificação protéica foi realizada a limpeza da amostra através da precipitação das proteínas, utilizando o 2-D Clean-up kit® (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante, então o precipitado foi solubilizado em solução de reidratação para realizar a focalização isoeletrica

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com o método de Westermeier e Naven (2002), com algumas modificações. Alíquotas contendo aproximadamente 70 µg ou 300 µg de proteínas precipitadas com o 2-D Clean-up kit® (a quantidade de proteínas é dependente do tamanho do IPG utilizado) foram solubilizadas em um volume final de 125 µl ou 250 µl, respectivamente, em uma solução de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% (p/v) CHAPS, 18 mM DTT, 0.5% (v/v) anfólitos pH 3-10 or pH 4-7 e traços de azul de bromofenol).

A focalização isoeletrica foi realizada em duas tiras de gradientes de pH imobilizado (IPG), pH 3-10 linear e pH 4-7 linear, e em dois tamanhos, de 7 e 13 cm (GE Healthcare). As tiras de IPG foram passivamente reidratadas durante 12 horas a temperatura ambiente no aparato *IPGphor strip holder*® (GE Healthcare) com 125 µl (tira de 7 cm) ou com 250 µl (tira de 13 cm) de amostra, contendo aproximadamente 70 µg ou 300 µg, respectivamente, cobertas com 1 ml de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes durante a reidratação.

A focalização isoeletrica foi iniciada logo após a reidratação e realizada no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), a 20 °C em quatro etapas totalizando 5750 Vh em IPG de 7 cm e 15503 Vh em IPG de 13 cm, com uma corrente máxima de 25 µA por tira. Após a IEF as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas a -80 °C para uso posterior.

Após a IEF, as tiras de IPG foram submetidas à redução/alquilação em solução de equilíbrio. Para a redução as tiras foram equilibradas em 5 ml de solução de equilíbrio (75 mM Tris/HCl pH 8,8, 2% (p/v) SDS, 6 M Uréia, 30% (v/v) glicerol, 1% (p/v) azul de bromofenol) e 1% (p/v) de DTT adicionado na hora, durante 15 minutos sob agitação (na horizontal). Em seguida, para a alquilação as tiras foram equilibradas em 5 ml com a mesma solução, mas no lugar de DTT foi adicionado 2,5% (p/v) de IAA, durante 15 minutos sob agitação. Após os dois passos de equilíbrio as tiras foram lavadas com água MilliQ e imediatamente submetidas à segunda dimensão.

A segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poli(acrilamida 12% (SDS-PAGE) usando o sistema Mini PROTEAN 3 (Bio-Rad), para os géis de 7 cm, e o sistema Hoefer SE

600 Ruby (Amersham Biosciences), para os géis de 13 cm. As tiras foram inseridas no topo do gel de acrilamida, na horizontal, em contato com o mesmo e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5 % (p/v) de agarose. A separação eletroforética das proteínas foi realizada em tampão Tris/Glicina/SDS, a 15 °C (no caso do géis de 13 cm), sob uma amperagem fixa de 15 mA/gel por 15 minutos, seguida de 30 mA/gel até o corante atingir o limite inferior do gel.

Após a segunda dimensão os géis foram fixados em 8% (v/v) de ácido fosfórico e 50% (v/v) etanol por 30 minutos, então os géis foram corados com uma solução azul de Coomassie G-250 (400 ml de solução A: 2% (v/v) de ácido fosfórico e 10% (p/v) de sulfato de amônio; 10 ml de solução B: 5% (p/v) de *Coomassie Brilliant Blue* G-250; mais 100 ml de 100% de metanol) durante 12 horas sob agitação. O excesso do corante foi removido com sucessivas lavagens com água destilada, os géis foram conservados em 0,1% (v/v) de ácido acético a 4 °C.

3.3 Obtenção e análise das imagens

A digitalização das imagens dos géis foi obtida no *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare) através do programa LabScan versão 6.0 (GE Healthcare) e as imagens foram analisadas com o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Todos os géis foram realizados em duplicatas para verificar a reprodutibilidade. As bandas foram detectadas em modo automático adotando os seguintes parâmetros: *smooth* = 2, área mínima = 21, saliência = 200,000. Após o procedimento automático, algumas adições ou deleções de bandas foram realizadas manualmente.

As massas moleculares (*M_w*) e pontos isoelétricos (*pI*) das proteínas obtidos experimentalmente foram determinados automaticamente pelo programa, a partir de 5 pontos de referência anotados manualmente e dos padrões de massa moleculares.

3.4 Digestão *in-gel* das proteínas

As bandas foram retirados do gel com o auxílio de ponteiras de 200 µl ou 1000 µl, estéreis e com suas pontas cortadas. As bandas foram transferidos para microtubos de 1,5 ml com 0,1% (v/v) ácido acético e armazenados a 4 °C até o momento da digestão.

Os fragmentos de gel contendo as proteínas foram descorados com 500 µl de uma solução de descoloração contendo 5% (v/v) de acetnitrila (ACN) em 25 mM de bicarbonato de amônio sob agitação.

Esse procedimento foi repetido até a completa descoloração da banda. Em seguida, as bandas foram desidratadas com 100 μ l de 100% de ACN por 15 minutos, até ficarem totalmente esbranquiçados, então, a acetona foi removida e os resíduos remanescentes do gel foram secos em sistema de centrifugação a vácuo (Speed Vac/Eppendorf) durante 10 minutos.

Os fragmentos dos géis foram reidratados com uma solução de tripsina (Promega) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,8, na concentração final de 10 μ g/ml. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo, foram aplicados 10 μ l de solução de enzima em cada fragmento, os géis permaneceram no gelo por 30 minutos, em seguida foram colocados em estufa a 37 °C durante no mínimo 12 horas.

Após a digestão enzimática, os peptídeos foram eluídos da acrilamida com solução de extração contendo 50% (v/v) de ACN e 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). Foram realizadas três etapas de extração, os fragmentos dos géis foram cobertos com 30 μ l de solução de extração e agitados durante 30 minutos em vortex, em cada etapa o sobrenadante foi transferido a um novo microtubo. Todas as alíquotas de sobrenadante foram reunidas em um mesmo tubo e concentradas durante 1 hora em um sistema a vácuo (Speed Vac/Eppendorf), até secagem completa. Então foram armazenados a - 20 °C para análises posteriores.

3.5 Espectrometria de Massa

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um espectrômetro de massa tipo MALDI/TOF modelo Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen Germany) em colaboração com o Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Os peptídeos extraídos foram inicialmente solubilizados em 4 μ l 0,1% (v/v) de TFA. Uma amostra de 1 μ l de cada banda digerida e concentrada foi homogeneizada com 1 μ l da solução saturada da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ml em 50% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) TFA). Em seguida, 0,5 μ l dessa mistura foi aplicada diretamente na placa do espectrômetro MALDI/TOF e foi permitida a cristalização a temperatura ambiente. Após a cristalização da amostra foram realizadas as análises espectrométricas.

Os espectros foram obtidos em modo positivo, refletor e extração retardada com uma voltagem de aceleração de 20 kV e frequência do laser de 50 Hz. A calibração externa foi realizada usando

um kit de calibração de peptídeos com massas entre 800 a 3200 Da (Bruker Daltonics) e com 200 tiros para cada espectro. Para a obtenção dos espectros de cada amostra foram realizados com 200 tiros, quatro passos de 50 tiros em diferentes lugares. Os espectros gerados foram analisados e processados com o programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics), os picos de contaminantes, como a queratina e tripsina, foram manualmente retirados da lista de peptídeos.

3.6 Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas usando os dados de *peptide mass fingerprinting* (PMF) contra o banco de dados NCBI (*NCBI-National Center for Biotechnology Information*) utilizando o algoritmo do programa de busca MASCOT (www.matrixscience.com). Os parâmetros de busca foram os seguintes: Banco de dados não redundante do NCBI, a categoria taxonômica *Mycoplasma*, enzima tripsina, uma clivagem perdida, modificação fixa da cisteína por carbamidometil, modificação variável por oxidação em metionina, tolerância de desvio de massa molecular de 100 ppm, a taxa de descobertas falsas foi estimada usando a função Decoy e valores de massa monoisotópicas. O programa MASCOT calcula um valor para cada proteína encontrada a partir da probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório (CAMARGO, 2008), portanto, o fator de confiança utilizado na identificação protéica foi de 95%.

3.7 Imunização dos animais

O soro de frango imunizados com *M. synoviae* foi obtido do Laboratório de Sanidade Animal – Setor de Biotecnologia de Suínos da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC. Primeiramente foi produzido o antígeno inativado (células de *M. synoviae*, a partir de cultivo, foram suspensas em PBS com timerosal na diluição de 1:10000). Um frango SPF (livre do patógeno específico) foi inoculado com 200 µl de antígeno inativado, sendo a primeira inoculação intradérmica e as demais intravenosas. As imunizações foram realizadas a cada sete dias por sete semanas. Na última semana o soro foi avaliado por soroglutinação rápida em placa (SAR), sendo observada forte reação, então o sangue total da ave foi coletado. O soro foi isolado das demais células sanguíneas, separado em alíquotas e armazenado a -20 °C. Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com as

leis brasileiras e aprovado por um comitê de ética da CNPSA/EMBRAPA.

3.8 Análise de proteínas imunogênicas

Para a detecção das proteínas imunogênicas do *M. synoviae* foi utilizada a metodologia de *immunoblot*. As proteínas resolvidas no gel bidimensional foram transferidas à membrana de PVDF (Millipore) usando o sistema Mini Protean 3 Western transblot (Bio-Rad). A membrana de PVDF foi previamente hidratada com 100% de metanol e equilibrada em solução de transferência a 4 °C (25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol) juntamente com o gel durante 30 minutos. A eletro-transferência foi realizada a 4 °C por 1 hora a 100 V. Em seguida, a transferência das proteínas de interesse foi confirmada pela coloração com *Ponceau* (0,1% (p/v) de corante *Ponceau*, 1% (v/v) de ácido acético), então a membrana foi lavada com 20 ml de solução de PBS-T (10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1% (v/v) Tween 20) até a retirada da coloração. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 50 ml da solução de PBS-T suplementado com 3% (p/v) de soro albumina bovina (BSA) durante 12 horas a 4 °C, para bloqueio de sítios inespecíficos.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com 20 ml de PBS-T, em seguida, a membrana foi submersa em 25 ml de PBS-T suplementado com 1% (p/v) de BSA contendo o anticorpo primário (soro de frango imunizado com *M. synoviae* ou soro de frango não imunizado/SPF) na diluição de 1:1000, durante 90 minutos, sob agitação e a temperatura ambiente.

Ao término da reação com o anticorpo primário a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com 20 ml de PBS-T. Então, a membrana foi submersa em 25 ml de PBS-T suplementado com 1% (p/v) de BSA contendo o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (anti-frango IgY (IgG), produzido em coelho, Sigma) na diluição de 1:15000, por 1 hora, sob agitação e a temperatura ambiente.

Após três lavagens por 10 minutos com 20 ml de PBS-T foi realizada a detecção das proteínas imunogênicas. A revelação das proteínas foi realizada com 10 ml da solução de BCIP®/NBT (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT Tablets-Sigma), seguindo as instruções do fabricante, sendo a reação finalizada submergindo a membrana em água MilliQ. Em seguida, as membranas foram secas a temperatura ambiente e digitalizadas com o *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Mycoplasma synoviae* é um importante patógeno de aves, sendo responsável por diversas perdas econômicas na produção avícola. Na maioria dos casos a infecção resulta em uma manifestação subclínica do trato respiratório, a qual pode evoluir para doenças respiratórias, sinovites ou doenças sistêmicas. Desta forma, as proteínas expressas pela bactéria despertam um grande interesse por estarem relacionadas ao seu desenvolvimento e à sua patogenicidade. O presente trabalho propôs uma descrição preliminar do mapa proteômico de *M. synoviae*, abordando principalmente as proteínas mais abundantes expressas pelo patógeno. A abordagem através da eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa possibilita a identificação das proteínas mais expressas pela célula, contribuindo significativamente para avançar na compreensão da biologia e das bases moleculares dos processos fisiológicos do microrganismo.

4.1 Perfil de extração das proteínas

De acordo com Canãs e colaboradores (2007), a extração de analitos em amostras biológicas é um sério desafio à química analítica. Não obstante, esta situação se torna muito mais complicada no estudo de proteínas, devido ao seu alto grau de heterogeneidade e à dificuldade de romper suas interações estruturais e liberá-las de interações macromoleculares. Normalmente, o método mais utilizado na extração protéica de amostras biológicas é a lise celular física associada ao uso de detergentes (CANÃS et al., 2007).

Duas estratégias de extração protéica foram testadas para a obtenção do proteoma do *M. synoviae*, a lise celular física e a lise física associada a detergentes. O melhor rendimento na extração total de proteínas foi obtido com a lise celular associada a detergentes (em média de 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas extraídas com a lise celular física e em média 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas extraídas com a lise celular física associada a detergentes). A análise através da eletroforese bidimensional demonstrou que a extração protéica por meio de lise física associada a detergentes apresentou melhores resultados, aumentando quantitativamente, em relação ao número de bandas detectadas, a resolução protéica (Figura 12 e 17).

Os detergentes são frequentemente utilizados na ruptura celular, eles rompem a membrana celular, interações hidrofóbicas e solubilizam

as proteínas. A escolha dos detergentes, na análise proteômica, é limitada aos não-iônicos ou zwitteriônicos para evitar interferência de cargas durante a focalização isoeletrica (CHOE et al., 2006). Utilizamos dois detergentes com o objetivo de melhorar a resolução da separação protéica, o zwitteriônico CHAPS e o aniônico SDS. O CHAPS, atualmente, é um dos detergentes mais utilizados em análises proteômicas (CIERO et al., 2004) e o SDS é um detergente amplamente utilizado em estudos bioquímicos, e, também é utilizado em alguns estudos proteômicos (WISNIEWSKI et al., 2009). Na extração protéica total, os dois detergentes alcançaram rendimento semelhante, porém como observado no perfil bidimensional das proteínas, a extração com SDS não permitiu uma boa resolução (Figura 15), observando-se muitas bandas horizontais, principalmente na faixa ácida do gel. Os detergentes aniônicos, como o SDS, possuem um forte poder de solubilização (BRAUN et al., 2007). Entretanto, o detergente nem sempre é completamente separado das proteínas, desta forma, no campo elétrico o SDS migra para a região do ânodo, resultando no deslocamento de alguns pontos para a região ácida, assim interferindo com a focalização isoeletrica das proteínas (WESTERMEIER e NAVEN, 2002).

4.2 Perfil dos géis bidimensionais

O *M. synoviae* possui 694 sequências codificantes (CDSs), 464 correspondem a proteínas conhecidas, 167 a proteínas hipotéticas conservadas e 63 a proteínas hipotéticas (VASCONCELOS et al., 2005).

O perfil das proteínas expressas pelo *M. synoviae* foi caracterizado usando um gradiente de pH 3-10 e pH 4-7 linear. Como pode ser observado ocorre um predomínio de proteínas com *pI* entre 4 a 7 e massas moleculares entre 19 a 80 kDa (Figura 12 a 17). Os géis foram realizados em duplicata e comparados com o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0. Após o processamento automático de detecção de bandas e correções manuais de todos os géis realizados, um total de 350 bandas foram detectadas na faixa de pH 3-10 na fração protéica solúvel, um total de 475 bandas foram detectadas na faixa de pH 3-10 na fração na fração protéica solúvel em CHAPS, um total de 286 bandas foram detectadas na faixa de pH 3-10 na fração na fração protéica solúvel em SDS e 124 bandas foram detectadas na faixa de pH 4-7 na fração protéica solúvel.

Assim, o perfil protéico de *M. synoviae* foi resolvido em dois padrões de eletroforese bidimensional. O primeiro foi realizado em géis

de 7 cm em pH 3-10 e pH 4-7, com três formas diferentes de extração no qual foi possível detectar 386 bandas na faixa de pH 3-10 e 124 bandas na faixa de pH 4-7. O segundo foi realizado em géis de 13 cm em pH 3-10, com três formas diferentes de extração, no qual detectamos 725 bandas (Tabela 1). Como observado nas Figuras 12 a 14 os géis de 7 cm apresentaram pouca reprodutibilidade e alguns problemas na resolução das proteínas, evidenciado pelas faixas de proteínas não focalizadas. No entanto, os mapas bidimensionais de 13 cm apresentaram uma alta reprodutibilidade e resolução (Figura 16 e 17).

Tabela 1: Perfil dos géis bidimensionais

<i>Método de extração</i>	<i>Tamanho do gel</i>	<i>Faixa de pH</i>	<i>Bandas detectadas</i>	<i>Bandas identificadas</i>
Lise física (fração solúvel)	7 cm	3-10	120	17
Lise física associada ao detergente SDS	7 cm	3-10	116	6
Lise física associada ao detergente CHAPS	7 cm	3-10	150	42
Total de bandas encontradas em géis de 7 cm			386	
Lise física associada ao detergente CHAPS	13 cm	3-10	325	40
Lise física (fração solúvel)	13 cm	3-10	230	26
Lise física associada ao detergente SDS	13 cm	3-10	170	4
Total de bandas encontradas em géis de 13 cm			725	
Total de bandas encontradas em géis de pH 3-10			1111	
Lise física (fração solúvel)	7 cm	4-7	124	25
Total de bandas encontradas em géis de 7 cm em pH 4-7			124	

Segundo Liebler (2002), apesar da superioridade do 2DE-SDS-PAGE em relação a outros métodos de separação de misturas protéicas, a técnica apresenta alguns problemas, como a dificuldade de realizar análises reprodutíveis e a incompatibilidade de algumas proteínas com a focalização isoeletrica, tais como, proteínas de alta massa molecular e aquelas com características hidrofóbicas. Essas proteínas aparecem como faixas de estrias na região da sua massa molecular. Outro problema reside em que proteínas expressas em pequenas quantidades dificilmente serão visualizadas. Portanto, o 2DE-SDS-PAGE tende a ser uma análise para proteínas abundantes.

A eletroforese bidimensional é sensível à presença de contaminantes tais como sais, lipídeos, ácidos nucleicos e outras

substâncias insolúveis. Os sais interferem diretamente na focalização isoelétrica, eles migram através do gradiente de pH provocando zonas de alta condutividade, nestas regiões ocorre interferência na migração protéica e assim as proteínas aparecem como faixas de estrias no gel (GOLINELLI, 2009).

A análise proteômica do *M. hyopneumoniae* e *M. gallisepticum* possibilitou a resolução de em média 350 bandas por gel corados com azul de Coomassie G-250 (PINTO et al., 2007; DEMINA et al., 2009). No proteoma do *M. penetrans* e do *M. pneumoniae* foram resolvidos aproximadamente 470 e 450 bandas, respectivamente, revelados com a coloração de prata (FERRER-NAVARRO et al., 2006; REGULA et al., 2000). No presente trabalho, através de uma análise semelhante, conseguimos a resolução de 325 bandas (Figura 17).

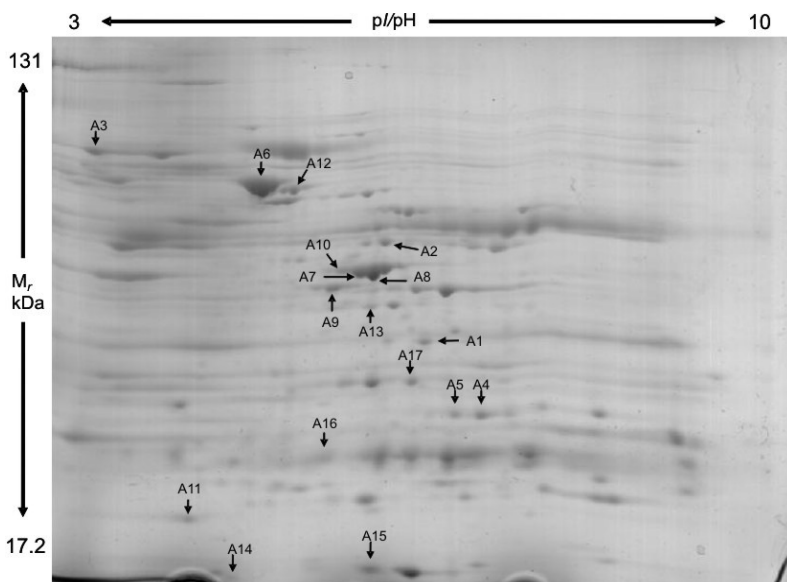


Figura 12. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel de *M. synoviae*. O extrato total protéico (70 μ g) foi separado em *strip* de 7 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de A1 a A17 correspondem às proteínas identificadas.

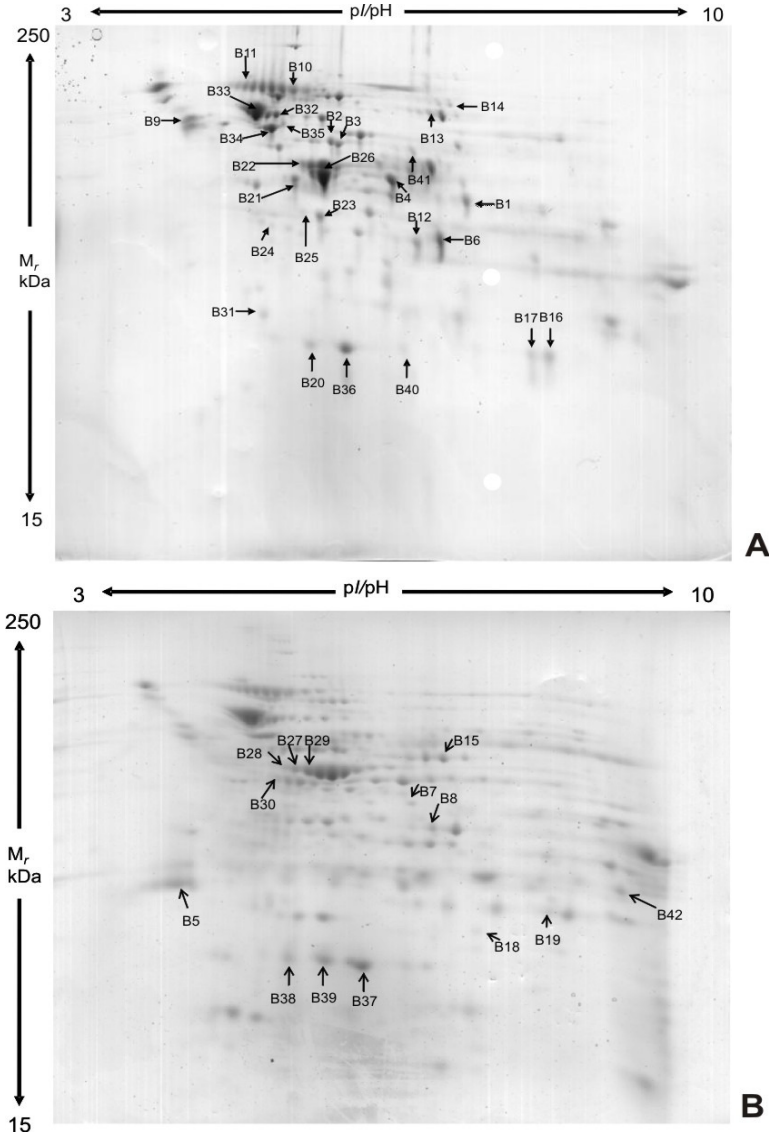


Figura 13. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em CHAPS de *M. synoviae*. (A e B são géis em duplicatas) O extrato total protéico solúvel em CHAPS (70 μ g) foi separado em *strip* de 7 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de B1 a B42 correspondem às proteínas identificadas.

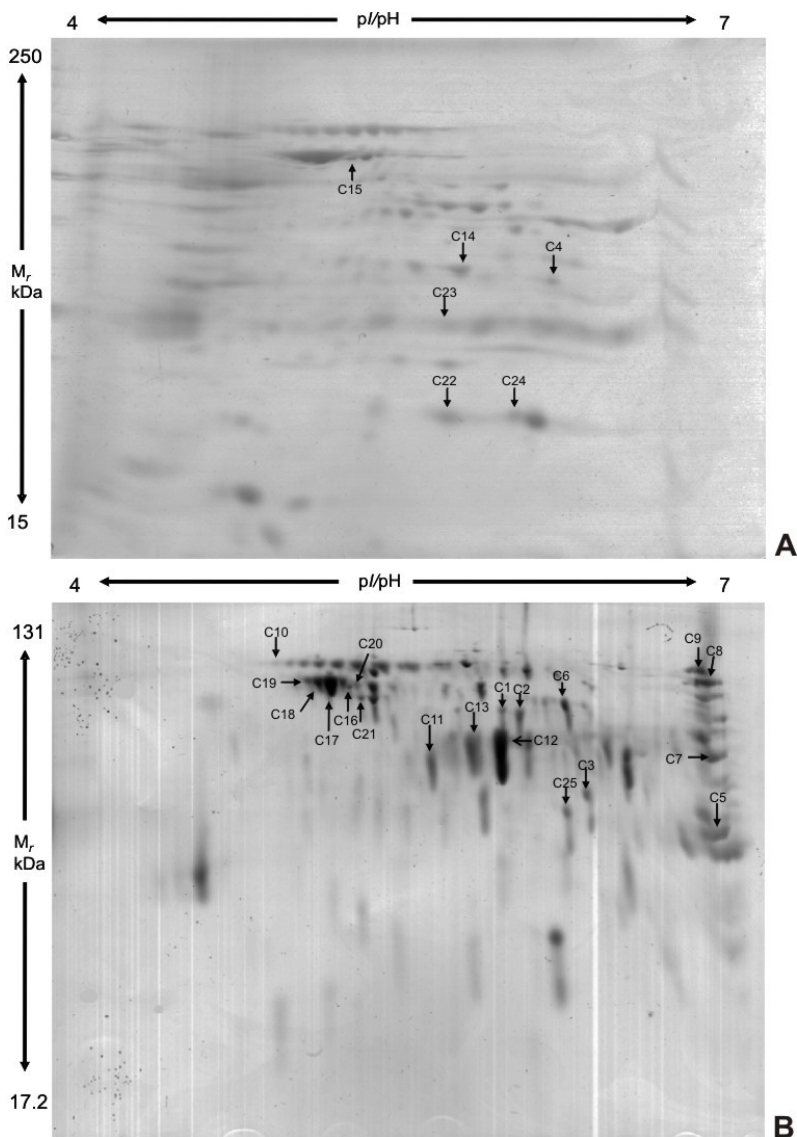


Figura 14. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel de *M. synoviae*. (A e B são géis em duplicatas) O extrato total protéico (70 μ g) foi separado em *strip* de 7 cm (pH 4-7) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de C1 a C25 correspondem às proteínas identificadas.

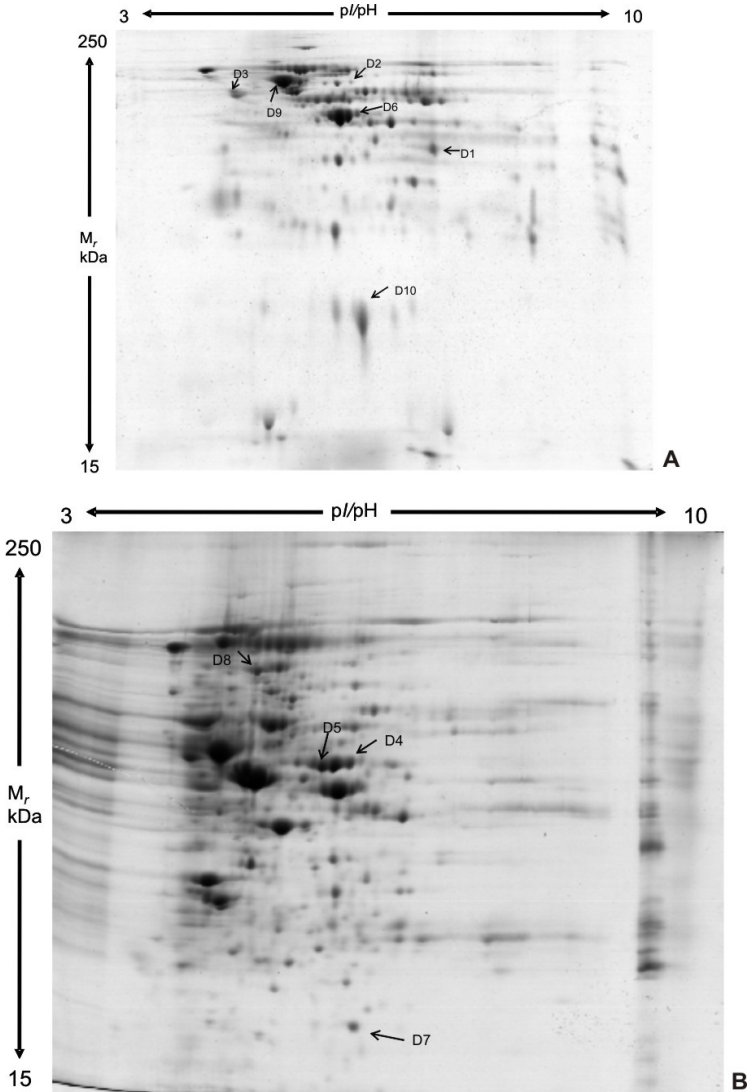


Figura 15. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em SDS de *M. synoviae*. (A) O extrato total protéico solúvel em SDS (70 μ g) foi separado em *strip* de 7 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. (B) O extrato total protéico solúvel em SDS (300 μ g) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de D1 a D10 correspondem às proteínas identificadas.

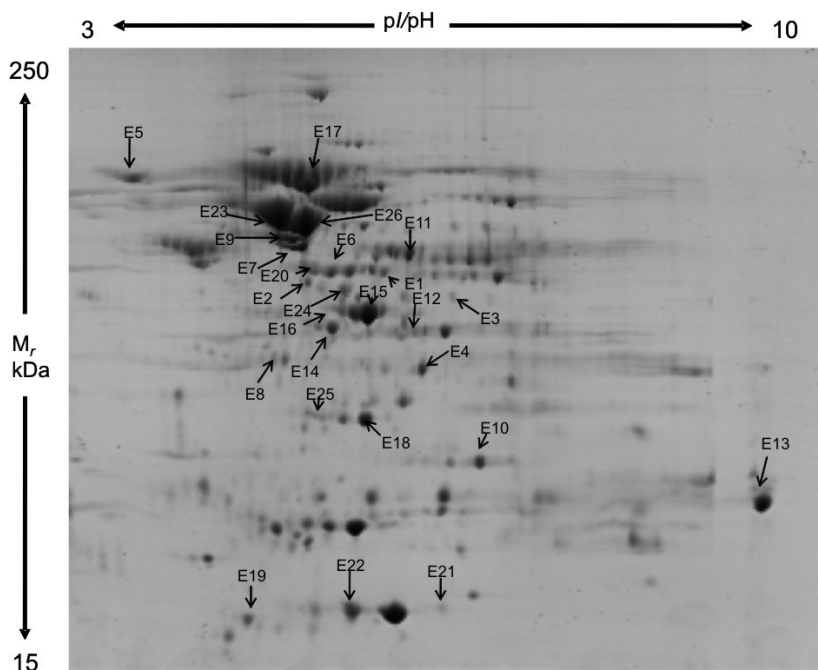


Figura 16. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel de *M. synoviae*. O extrato total protéico (300 μ g) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de E1 a E26 correspondem às proteínas identificadas.

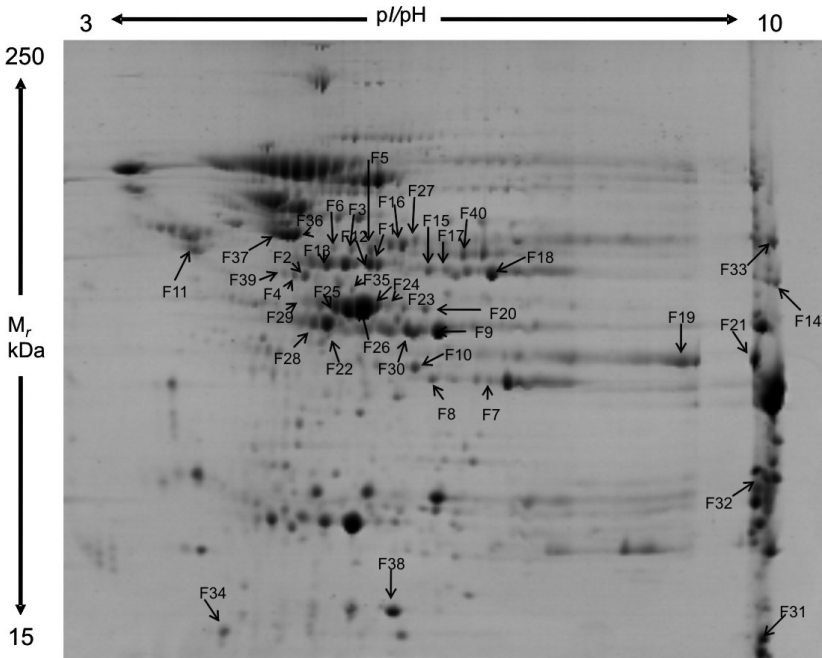


Figura 17. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em CHAPS de *M. synoviae*. O extrato total protéico solúvel em CHAPS (300 μ g) foi separado em *strip* de 13 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de F1 a F40 correspondem às proteínas identificadas.

4.3 Proteínas de *Mycoplasma synoviae* identificadas

Para realizar a identificação das proteínas obtidas a partir da eletroforese bidimensional, todas as bandas resolvidas em pH 3-10 e pH 4-7 foram retiradas do gel, digeridos com tripsina e analisados por espectrometria de massa MALDI/TOF.

Os espectros foram analisados utilizando o programa FlexAnalysis 3.0, os picos de contaminantes, como exemplo a queratina e tripsina, foram manualmente retirados da lista de peptídeos. Os espectros resultantes foram analisados utilizando-se o algoritmo do programa de busca MASCOT (www.matrixscience.com). Optou-se pelo banco de dados NCBI não redundante e a categoria taxonômica *Mycoplasma*. Pelo fato das amostras serem reduzidas e alquiladas,

selecionou-se a modificação fixa de carbamidometil e modificação variável oxidação em metionina. A tolerância de peptídeos foi de 100 ppm e o fator de confiança na identificação protéica utilizado foi o $p < 0,05$.

Um total de 1235 bandas foram analisadas por espectrometria de massa. Esta análise revelou a identificação de 160 bandas, sendo 135 bandas resolvidas em pH 3-10 e 25 bandas em pH 4-7. As 160 bandas identificadas correspondem a 42 proteínas diferentes e estão indicadas nas Figuras 12 a 17 e os resultados obtidos estão nas tabelas 2 a 7.

A eficiência de identificação do presente estudo, cerca de 12,96%, é similar aquela obtida por Pinto e colaboradores (2007) que obteve na faixa de 11,6% nos resultados apresentados no proteoma do *M. hyopneumoniae*. Já a análise de proteoma de outros micoplasmas os resultados obtidos foram: 53,13% para *M. gallisepticum*, 68,6% para *M. pneumoniae*, 37% para *M. genitalium* e 31,27% para *M. penetrans* de eficiência (DEMINA et al., 2009; REGULA et al., 2000; WASINGER et al., 2000; FERRER-NAVARRO et al., 2006).

A maioria das bandas não produziram espectros de massa que permitissem identificar as proteínas, possivelmente devido à presença de contaminantes que dificultaram a acessibilidade da tripsina e/ou que interferiram na análise por espectrometria de massa, à influência da sequência primária da proteína que dificultaria a atividade da tripsina, e à dificuldade na eluição dos peptídeos do gel.

A técnica de ionização por MALDI/TOF possui extrema sensibilidade, detecta peptídeos em concentrações de fmol/atomol, e consegue detectar impurezas em pequenas quantidades na amostra protéica, o que dificulta a análise. Dependendo da quantidade do analito, no caso de baixa concentração, os contaminantes são capazes de competir fortemente pelo processo de ionização do MALDI, suprimindo o sinal da amostra (SACHON et al., 2009). Neste sentido, Sachon e colaboradores (2009) demonstraram que uma amostra de BSA com alta quantidade de contaminante não obteve identificação pela busca no MASCOT. Portanto, os contaminantes são extremamente prejudiciais, pois levam a erros na identificação, diminuem a confiança da identificação ou até mesmo impedem a identificação da amostra.

É bem caracterizado que os sítios de acesso da tripsina em resíduos de arginina e lisina na região C-terminal quando seguidos por prolina inibem a clivagem enzimática, bem como a presença de resíduos ácidos adjacentes ao sítio de clivagem (CELEDÓN, 2006).

De acordo com Galvani e colaboradores (2000), durante a eletroforese, picogramas de proteínas podem reagir irreversivelmente

com a malha de poliacrilamida, sugerindo que pequenas quantidades de proteína são incorporadas a matriz. Portanto, essa ligação irreversível pode provocar uma supressão na intensidade do sinal da espectrometria de massa por MALDI. A ligação irreversível das proteínas à poliacrilamida provoca baixa eluição dos peptídeos do gel, e consequentemente, a obtenção de pouco sinais nos espectros, o que resulta na redução da taxa de identificação.

A massa molecular (Mw) e o ponto isoelétrico (pI) de cada proteína foi experimentalmente determinado e comparado com o Mw/pI deduzido através da sequência gênica obtida pela análise realizada com o banco de dados MASCOT. Nós observamos que 125 proteínas das 160 identificadas apresentam um Mw/pI semelhante ao valor teórico estimado. Para as outras 35 proteínas (indicadas em negrito nas tabelas) o Mw e/ou pI experimentalmente determinado apresentaram valores significativamente distintos dos preditos, sugerindo a ocorrência de modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica (BOONJAKUAKUL et al., 2002; SU et al., 2007).

Entre as proteínas identificadas no presente estudo, a chaperona DnaK, o fator de alongação Tu e a tiol peroxidase foram representadas por mais de uma bandas, muitos apresentando diferenças na massa molecular e no ponto isoelétrico. A grande proeminência dessas proteínas é um indicativo de uma expressão constitutiva.

A ocorrência de múltiplas bandas de uma mesma proteína já foi descrito em estudo do proteoma de diferentes micoplasmas como *M. gallisepticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. penetrans*, *M. genitalium* e *M. pneumoniae* (DEMINA et al., 2009; PINTO et al., 2007; FERRER-NAVARRO et al., 2006; WASINGER et al., 2000; REGULA et al., 2000). Esse comportamento também é relatado em análises proteômicas de outras espécies, por exemplo, no proteoma de *Herbaspirillum seropedicae* (CHAVES et al., 2007) e no proteoma de *Bartonella quintana* (BOONJAKUAKUL et al., 2007).

Muitas proteínas identificadas no proteoma do *M. pneumoniae* foram representadas em múltiplas bandas em várias posições no gel, uma dessas proteínas foi a chaperona DnaK (REGULA et al., 2000). Essa proteína é uma das mais proeminentes encontradas em extratos protéticos de *Mycoplasma*, e foi encontrada como uma série de bandas, com a massa molecular idêntica. No presente mapa proteômico, também encontramos múltiplas bandas de DnaK e fator de alongação Tu com massa molecular semelhante (Figura 18).

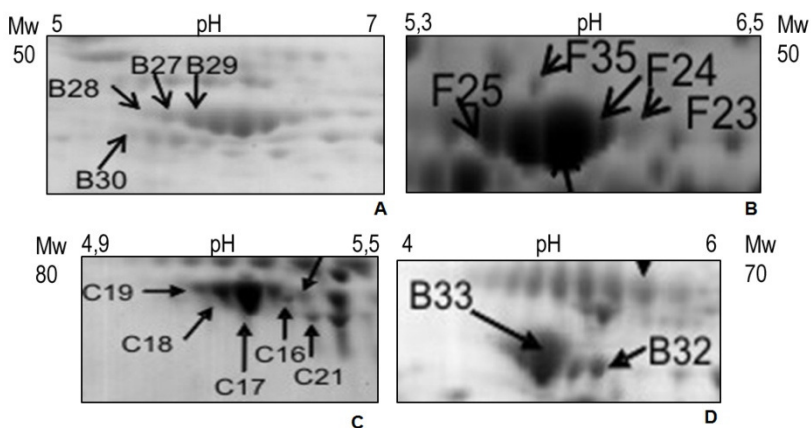


Figura 18. Proteínas do *M. synoviae* identificadas em múltiplas bandas. Localizadas na mesma faixa de Mw e com variações no seu *pI*. A e B correspondem ao fator de alongação Tu (B27, B28, B29, F23, F24 e F25). C e D correspondem à chaperona DnaK (C16, C17, C18, C19, B32 e B33). As figuras A e D correspondem à fração protéica solúvel em CHAPS (7 cm, pH 3-10), a figura B corresponde à fração protéica solúvel em CHAPS (13 cm, pH 3-10) e a figura C corresponde à fração solúvel (7 cm, pH 4-7).

Tabela 2. Proteínas identificadas da fração solúvel de *M. synoviae* (pH 3-10, 7 cm)

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>MASCOT Score</i>	<i>Cobertura %</i>	<i>Peptídeo encontrado</i>	<i>Gene Locus</i>	<i>COG^a</i>
A1	Diidrolipoamida desidogenase	5,87/66333	6,6/33463	70	28	10	<i>pdhD</i> MS53_0275	C
A2	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50831	6,23/48444	111	32	10	<i>AtpD</i> MS53_0405	C
A3	Proteína de divisão celular	4,38/59956	3,38/72924	215	33	14	<i>FtsZ</i> MS53_0340	D
A4	Frutose-bifosfato aldolase	6,27/31276	7,17/23255	88	34	7	<i>Fba</i> MS53_0354	G
A5	Frutose-bifosfato aldolase	6,27/31276	6,9/23351	109	25	8	<i>Fba</i> MS53_0354	G
A6	Fator de alongação EF-Ts	5,72/31919	5,00/61621	73	33	6	<i>Tsf</i> MS53_0414	J
A7	Fator de alongação Tu	5,61/43317	5,95/42366	94	26	8	<i>tufA</i> MS53_0667	J
A8	Fator de alongação Tu	5,61/43203	6,10/42336	216	53	17	<i>tufA</i> MS53_0667	J
A9	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,7/40150	92	23	8	<i>tufA</i> MS53_0667	J
A10	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,82/42658	123	39	11	<i>tufA</i> MS53_0667	J
A11	Proteína SSB	4,50/21284	4,30/17218	65	39	5	<i>Ssb</i> MS53_0533	L
A12	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,33/61199	137	25	14	<i>dnaK</i> MS53_0351	O

A13	Tiol peroxidase	5,93/18310	6,10/37817	81	34	8	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
A14	Tiol peroxidase	5,93/18309	4,7/17218	159	56	13	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
A15	Tiol peroxidase	5,93/18310	6,06/17218	117	38	9	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
A16	Tiol peroxidase	5,93/18310	5,88/20959	141	45	12	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
A17	Tioredoxina redutase	5,37/27538	6,50/27760	79	23	8	<i>trxB</i> MS53_0596	O

Proteínas com valores de Mw e/ou pI experimentalmente determinados significativamente distintos dos preditos estão indicadas em negrito

- a) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossomal; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses; (L) Replicação, recombinação e reparo; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas.

Tabela 3. Proteínas identificadas da fração solúvel em CHAPS de *M. synoviae* (pH 3-10, 7 cm)

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>MASCOT Score</i>	<i>Cobertura %</i>	<i>Peptídeos encontrados</i>	<i>Gene Locus</i>	<i>COG^a</i>
B1	Acetato quinase	7,10/44601	7,57/38926	62	19	6	<i>ackA</i> MS53_0652	C
B2	F0F1 ATP sintetase subunidade beta	5,75/52574	6,02/52668	138	32	11	<i>atpD-2</i> MS53_0160	C
B3	F0F1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50831	6,11/52123	119	34	14	<i>atpD-2</i> MS53_0160	C
B4	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade alfa	6,20/42105	6,75/43671	142	41	14	<i>pdhA</i> MS53_0272	C
B5	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade alfa	6,20/42219	4,44/21999	61	17	6	<i>pdhA</i> MS53_0272	C
B6	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/35831	7,30/31723	97	40	11	<i>pdhB</i> MS53_0273	C
B7	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/35831	7,25/36525	122	38	12	<i>pdhB</i> MS53_0273	C
B8	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/35962	7,40/31891	54	13	3	<i>pdhB</i> MS53_0273	C
B9	Proteína de divisão celular	4,38/59953	4,44/60081	71	12	6	<i>ftsZ</i> MS53_0340	D
B10	Putativa lipoproteína	5,13/10067	5,10/68776	60	14	10	MS53_0190	E
B11	Ribonucleotídeo-difosfato redutase	5,09/39273	4,84/70221	80	14	5	<i>nrdF</i> MS53_0399	F
B12	Frutose-bifosfato aldolase	6,27/31218	7,0/31376	82	35	9	<i>fbA</i> MS53_0354	G
B13	Fosfoglicerato quinase	6,13/43491	7,16/60495	52	20	4	<i>pgk</i> MS53_0114	G

B14	Fosfoglicerato quinase	6,13/43491	7,38/63507	51	18	5	<i>pgk</i> MS53_0114	G
B15	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49358	7,17/56185	174	35	13	<i>eno</i> MS53_0009	G
B16	Fosfodiesterase carregadora de grupo acil	7,74/22732	8,51/20000	66	37	8	<i>acpD</i> MS53_0088	I
B17	Fosfodiesterase carregadora de grupo acil	7,74/22731	8,28/20041	68	29	11	<i>acpD</i> MS53_0088	I
B18	Fosfodiesterase carregadora de grupo acil	7,74/22731	7,92/20614	56	20	4	<i>acpD</i> MS53_0088	I
B19	Fosfodiesterase carregadora de grupo acil	7,74/22731	8,75/22917	82	26	5	<i>acpD</i> MS53_0088	I
B20	Proteína ribossomal L3 50S	9,68/28810	5,78/20630	51	17	4	<i>rplC</i> MS53_0643	J
B21	Fator de alongação Tu	5,61/43203	5,72/41792	164	37	17	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B22	Fator de alongação Tu	5,61/43317	5,70/40205	106	24	7	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B23	Fator de alongação Tu	5,61/43317	5,97/47205	73	25	9	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B24	Fator de alongação Tu	5,61/43317	5,53/36063	124	35	22	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B25	Fator de alongação Tu	5,61/43317	5,78/34135	85	19	12	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B26	Fator de alongação Tu	5,61/43317	5,94/47365	173	42	23	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B27	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,82/73687	74	17	5	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B28	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,66/73793	74	17	5	<i>tufA</i> MS53_0667	J
B29	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,97/67458	73	16	5	<i>tufA</i> MS53_0667	J

B30	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,62/55545	64	12	4	tufA	J
B31	DNA polimerase III subunidade beta	7,63/43489	5,15/21909	69	19	6	MS53_0667	L
B32	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,23/60709	98	22	12	<i>dnaK</i>	O
B33	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,16/61343	122	20	12	MS53_0351 <i>dnaK</i>	O
B34	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,41/56058	90	21	10	MS53_0351	O
B35	Putativo fator trigger	5,37/54529	5,40/57834	93	20	9	<i>dnaK</i> MS53_0351 MS53_0351	O
B36	Tiol peroxidase	5,93/18310	6,19/20418	85	34	7	MS53_0603 <i>tpx</i>	O
B37	Tiol peroxidase	5,93/18310	6,39/18564	60	46	7	MS53_0368 <i>tpx</i>	O
B38	Tiol peroxidase	5,93/18309	5,74/18043	62	21	6	MS53_0368 <i>tpx</i>	O
B39	Tiol peroxidase	5,93/18309	6,16/17788	78	25	7	MS53_0368 <i>tpx</i>	O
B40	Proteína hipotética MS53_0538	6,30/20619	6,95/20173	110	41	7	MS53_0368 MS53_0538	R
B41	NADH oxidase	6,44/50670	6,96/50174	80	25	9	<i>nox</i>	R
B42	Proteína hipotética MS53_0115	8,78/21046	9,58/25000	59	20	5	MS53_0522 MS53_0115	S

Proteínas com valores de Mw e/ou pI experimentalmente determinados significativamente distintos dos preditos estão indicadas em negrito

- a) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossomal; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (I) Transporte e metabolismo de lipídeos; (J) Tradução, estrutura ribossomal e

biogêneses; (L) Replicação, recombinação e reparo; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; (R) Somente função geral predita; (S) Função desconhecida.

Tabela 4. Proteínas identificadas da fração solúvel de *M. synoviae* (pH 4-7, 7 cm)

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>MASCOT Score</i>	<i>Cobertura %</i>	<i>Peptídeos encontrados</i>	<i>Gene Locus</i>	<i>COG^a</i>
C1	FOF1 ATP sintetase subunidade alfa	7,66/57947	5,98/50000	142	29	10	<i>atpD-2</i> MS53_0159	C
C2	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50831	6,06/49101	133	34	14	<i>atpD</i> MS53_0405	C
C3	Fosfotransacetilase	6,06/34978	6,36/31744	192	52	14	<i>eutD</i> MS53_0653	C
C4	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade, alfa	6,20/42221	6,54/39784	73	23	10	<i>pdhA</i> MS53_0272	C
C5	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/35831	6,98/24854	157	56	13	<i>pdhB</i> MS53_0273	C
C6	Fosfoglicerato mutase	5,91/56365	6,26/53247	62	14	6	<i>Pgm</i> MS53_0656	G
C7	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49358	6,93/39069	135	34	12	<i>Eno</i> MS53_0009	G
C8	Proteína conservada hipotética	8,72/83696	6,92/64308	67	15	8	MS53_0334	H
C9	Proteína conservada hipotética	8,72/83696	6,88/73443	140	27	17	MS53_0334	H
C10	Fator de alongação EF-Ts	5,72/31919	4,95/80593	94	28	7	<i>Tsf</i> MS53_0414	J
C11	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,66/38928	77	26	9	<i>tufA</i> MS53_0667	J
C12	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,97/43561	151	42	16	<i>tufA</i> MS53_0667	J
C13	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,84/42934	112	30	10	<i>tufA</i> MS53_0667	J

C14	Fator de alongação Tu	5,61/43319	6,10/42623	128	37	14	<i>tufA</i> MS53_0667	J
C15	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,42/65671	94	15	6	<i>dnaK</i> MS53_0351	O
C16	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,25/66596	70	19	8	<i>dnaK</i> MS53_0351	O
C17	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,20/63060	121	29	17	<i>dnaK</i> MS53_0351	O
C18	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,18/69936	80	17	7	<i>dnaK</i> MS53_0351	O
C19	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,14/71919	76	11	5	<i>dnaK</i> MS53_0351	O
C20	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,35/69449	91	13	6	<i>dnaK</i> MS53_0351	O
C21	Putativo fator trigger	5,37/54529	5,39/56310	95	19	8	MS53_0603	O
C22	Tiol peroxidase	5,93/ 18310	6,16/22502	109	57	12	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
C23	Tiol peroxidase	5,93/18310	5,99/24683	90	34	9	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
C24	Tiol peroxidase	5,93/18309	6,25/20747	71	31	8	<i>Tpx</i> MS53_0368	O
C25	Tioredoxina redutase	5,92/33513	6,27/28619	69	27	7	<i>trxB</i> MS53_0596	O

Proteínas com valores de Mw e/ou pI experimentalmente determinados significativamente distintos dos preditos estão indicadas em negrito

- a) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Transporte e metabolismo de coenzima; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas.

Tabela 5. Proteínas identificadas da fração solúvel em SDS de *M. synoviae* (pH 3-10, 7 e 13 cm)

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>MASCOT Score</i>	<i>Cobertura %</i>	<i>Peptídeos Encontrados</i>	<i>Gene Locus</i>	<i>COG^a</i>
D1	Fator de elongação Tu	5,61/43319	6,25/38600	70	17	5	tufA MS53_0667	J
D2	Fator de elongação Tu	5,61/43319	5,94/38000	105	22	7	tufA MS53_0667	J
D3	Tiol peroxidase	5,93/18310	6,28/13028	67	25	6	Tpx MS53_0368	O
D4	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,22/67422	53	11	4	dnaK MS53_0351	O
D5	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/ 35831	7,34/39395	123	33	8	pdhB MS53_0273	C
D6	Proteína de divisão celular	4,38/59953	4,25/75000	150	21	10	ftsZ MS53_0340	D
D7	Proteína de divisão celular	4,38/59953	4,6/65942	67	12	5	ftsZ MS53_0340	D
D8	Fator de elongação Tu	5,61/43317	6,29/50975	108	23	8	tufA MS53_0667	J
D9	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,59/75000	55	14	7	dnaK MS53_0351	O
D10	Tiol peroxidase	5,93/18309	6,35/19583	66	21	6	Tpx MS53_0368	O

Proteínas com valores de Mw e/ou pI experimentalmente determinados significativamente distintos dos preditos estão indicadas em negrito

- a) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossomal; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas;

Tabela 6. Proteínas identificadas da fração solúvel de *M. synoviae* (pH 3-10, 13 cm)

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>MASCOT Score</i>	<i>Cobertura %</i>	<i>Peptídeos encontrados</i>	<i>Gene Locus</i>	<i>COG^a</i>
E1	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50831	6,10/57687	117	43	17	atpD MS53_0405	C
E2	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,37/50438	5,35/55032	104	30	9	atpD-3 MS53_0464	C
E3	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50831	6,76/51711	111	32	12	atpD MS53_0405	C
E4	Fosfotransacetilase	6,06/34978	6,48/40272	111	41	11	eutD MS53_0653	C
E5	Proteína de divisão celular	4,38/59956	3,67/73535	72	9	5	ftsZ MS53_0340	D
E6	Leucil aminopeptidase	5,83/52361	5,58/57687	76	18	6	pepA-1 MS53_0153	E
E7	Leucil aminopeptidase	5,83/52361	5,20/64029	96	26	8	pepA-1 MS53_0153	E
E8	Ribonucleotídeo-difosfato redutase subunidade beta	5,09/39272	5,02/41551	69	19	5	nrdF MS53_0399	F
E9	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49358	5,12/67005	124	29	11	eno MS53_0009	G
E10	Frutose-bifosfato aldolase	6,27/31276	7,02/31057	109	25	8	fbA MS53_0354	G
E11	Fosfoglicerato mutase	5,91/56422	6,33/62885	54	14	7	pgm MS53_0656	G
E12	S-adenosil metionina sintetase	5,95/42492	6,39/45640	84	18	6	metK MS53_0610	H
E13	Fator de alongação Tu	5,61/ 43317	9,27/27932	80	26	13	tufA MS53_0667	J
E14	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,59/46118	139	47	13	tufA	J

E15	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,95/48397	57	24	7	MS53_0667 tufA	J
E16	Fator de alongação Tu	5,61/43319	5,67/48968	88	16	6	MS53_0667 tufA	J
E17	Fator de alongação G	5,29/77385	5,43/75118	97	19	10	MS53_0667 fusA	J
E18	Fator de alongação EF-Ts	5,72/31919	5,91/34564	94	28	7	MS53_0047 tsf	J
E19	Proteína GreA	4,97/17905	4,77/18924	61	28	4	MS53_0414 greA	K
E20	Proteína hipotética MS53_0491	6,04/63855	5,42/58174	52	15	8	MS53_0379 MS53_0491	NO
E21	Tiol peroxidase	5,93/18309	6,2/19416	81	34	8	tpx MS53_0368	O
E22	Tiol peroxidase	5,93/18309	5,77/20278	159	56	13	tpx MS53_0368	O
E23	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,04/74874	98	22	12	dnaK MS53_0351	O
E24	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,71/53391	56	10	4	dnaK MS53_0351	O
E25	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,43/35004	62	13	5	dnaK MS53_0351	O
E26	Chaperona DnaK	5,18/65056	5,46/71549	94	15	6	dnaK MS53_0351	O

Proteínas com valores de Mw e/ou pI experimentalmente determinados significativamente distintos dos preditos estão indicadas em negrito

- a) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossomal; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Transporte e metabolismo de coenzima; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses; (K) Transcrição; (NO) Não está no COG; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas.

Tabela 7. Proteínas identificadas da fração solúvel em CHAPS de *M. synoviae* (pH 3-10, 13 cm)

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr Teórico</i>	<i>pI/Mr Observado</i>	<i>MASCOT Score</i>	<i>Cobertura %</i>	<i>Peptídeos encontrados</i>	<i>Gene Locus</i>	<i>COG^a</i>
F1	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50830	6,04/52261	138	32	11	atpD MS53_0405	C
F2	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,37/50438	5,32/49617	61	13	5	atpD-3 MS53_0464	C
F3	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,76/50830	5,81/52358	142	29	10	atpD MS53_0405	C
F4	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,37/50438	5,22/49835	134	20	8	atpD-3 MS53_0464	C
F5	FOF1 ATP sintetase subunidade beta	5,75/52574	5,95/56363	83	16	6	atpD-2 MS53_0160	C
F6	ATP sintetase cadeia beta	5,75/52574	5,77/56572	93	24	10	atpD-2 MS53_0160	C
F7	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/35831	7,12/36807	127	28	7	pdhB MS53_0273	C
F8	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	6,73/35831	6,56/36961	171	42	13	pdhB MS53_0273	C
F9	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade alfa	6,20/42221	6,62/42262	142	41	14	pdhA MS53_0272	C
F10	Fosfotransacetilase	6,06/34978	6,39/38156	76	19	7	eutD MS53_0653	C
F11	Proteína de divisão celular	4,38/59953	4,19/56260	215	33	14	ftsZ MS53_0340	D
F12	Leucil aminopeptidase	5,83/52359	5,95/52454	123	30	11	pepA-1 MS53_0153	E
F13	Leucil aminopeptidase	5,83/52359	5,54/52454	144	32	12	pepA-1 MS53_0153	E
F14	Serina hidroxil metil transferase	9,26/47011	9,91/48645	62	13	4	glyA	E

							MS53_0305	
F15	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49357	6,53/50743	106	21	7	eno	G
F16	Fosfoglicerato mutase	5,91/56422	6,27/57412	58	12	5	MS53_0009 pgm	G
F17	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49357	6,7/51024	100	19	6	MS53_0656 eno	G
F18	Fosfopiruvato hidratase	6,59/49357	7,14/49945	174	35	13	MS53_0009 eno	G
F19	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	8,28/36746	8,99/38790	128	33	9	MS53_0009 gap	G
F20	Fosfoglicerato quinase	5,26/37278	6,49/45192	52	20	4	MS53_0200 pgk	G
F21	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	8,28/36748	9,7/39004	114	34	9	MS53_0114 gap	G
F22	Fator de elongação Tu	5,61/43319	5,54/43201	118	30	9	MS53_0200 tufA	J
F23	Fator de elongação Tu	5,61/43319	6,13/45591	85	22	7	MS53_0667 tufA	J
F24	Fator de elongação Tu	5,61/43317	6,04/45541	121	26	9	MS53_0667 tufA	J
F25	Fator de elongação Tu	5,61/43317	5,61/45641	114	22	7	MS53_0667 tufA	J
F26	Fator de elongação Tu	5,61/43317	5,89/45192	150	38	11	MS53_0667 tufA	J
F27	Lisil-RNAt sintetase	6,10/57399	6,4/58588	53	12	6	MS53_0667 LysS	J
F28	Fator de elongação Tu	5,61/43317	5,4/43391	114	22	7	MS53_0611 tufA	J
F29	Fator de elongação Tu	5,61/43317	5,33/46247	50	13	4	MS53_0667 tufA	J

F30	Fator de alongação Tu	5,61/43317	6,31/42495	89	19	6	tufA MS53_0667	J
F31	Proteína ribossomal L9 50S	9,38/17358	9,72/13108	62	28	5	rplI MS53_0426	J
F32	Proteína ribossomal L1 50S	9,62/25213	9,81/28203	56	18	5	rplA MS53_0623	J
F33	Protil-RNAt sintetase	9,11/55642	9,88/57943	125	25	10	proS MS53_0492	J
F34	Fator de alongação Tu	5,61/43317	4,6/17045	51	11	3	tufA MS53_0667	J
F35	Proteína hipotética MS53_0598	5,60/44451	5,78/47535	51	8	3	MS53_0598	NO
F36	Putativo fator trigger	5,37/ 54529	5,25/60119	66	14	6	MS53_0603	O
F37	Fator Trigger	5,31/53899	5,07/60230	96	19	11	Tig MS53_0603	O
F38	Tiol peroxidase	5,93/18309	6,18/16202	90	34	9	tpx MS53_0368	O
F39	NADH oxidase	6,44/50666	5,13/50277	187	33	12	nox MS53_0522	R
F40	NADH oxidase	6,44/50666	6,86/54324	148	29	10	nox MS53_0522	R

Proteínas com valores de Mw e/ou pI experimentalmente determinados significativamente distintos dos preditos estão indicadas em negrito

- a) Classes funcionais COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossomal; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Transporte e metabolismo de coenzima; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses; (NO) Não está no COG; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; (R) Somente função geral predita.

4.4 Perfil do proteoma de *M. synoviae*

As 160 bandas protéicas identificadas foram classificadas de acordo com a sua classe funcional através do *Clusters of Orthologous Groups of proteins* -COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/proteinclusters>) em 4 classes e 14 categorias. A distribuição está apresentada na Figura 19 e na tabela 8.

A maioria das proteínas identificadas pertence às classes de Metabolismo (63) e Armazenamento e processamento da informação (46), e as seguintes categorias: (C) Produção e conversão de energia, (G) Transporte e metabolismo de carboidratos, (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses, (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas.

O estudo proteômico do *M. genitalium* mostrou um quadro semelhante aos encontrados no presente trabalho, pois descreve que a maioria das proteínas identificadas pertence à categoria de tradução, estrutura ribossomal e biogêneses (WASINGER et al., 2000). No proteoma do *M. hyopneumoniae* a maior parte das proteínas identificadas encontra-se na categoria das proteínas não classificadas, seguida pela categoria de transporte e metabolismo de carboidratos (PINTO et al., 2007). No proteoma do *M. penetrans* e do *M. gallisepticum* foi observado que as principais categorias são das proteínas não classificadas e de tradução, estrutura ribossomal e biogênese (FERRER-NAVARRO et al., 2006; DEMINA et al., 2009).

No presente estudo não detectamos proteínas pertencentes às seguintes categorias funcionais: mecanismos de defesa, mecanismos de transdução de sinais, parede celular/membrana/biogênese de envelope, tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular, metabolismo e transporte de íon inorgânico, e biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundário (tabela 8). Ferrer-Navarro e colaboradores (2006), não encontraram proteínas pertencentes às categorias de transdução de sinal, motilidade celular, tráfico intracelular e transporte de coenzima no proteoma do *M. penetrans*. Os autores colocam que a expressão de proteínas pertencentes a essas categorias é provavelmente muito baixa ou dependente de uma condição fisiológica específica.

As proteínas de *M. synoviae* identificadas são predominantemente proteínas citoplasmáticas: das 42 proteínas diferentes 37 são citoplasmáticas, tendo sido identificadas apenas 5 proteínas de membrana, envolvidas na produção de energia.

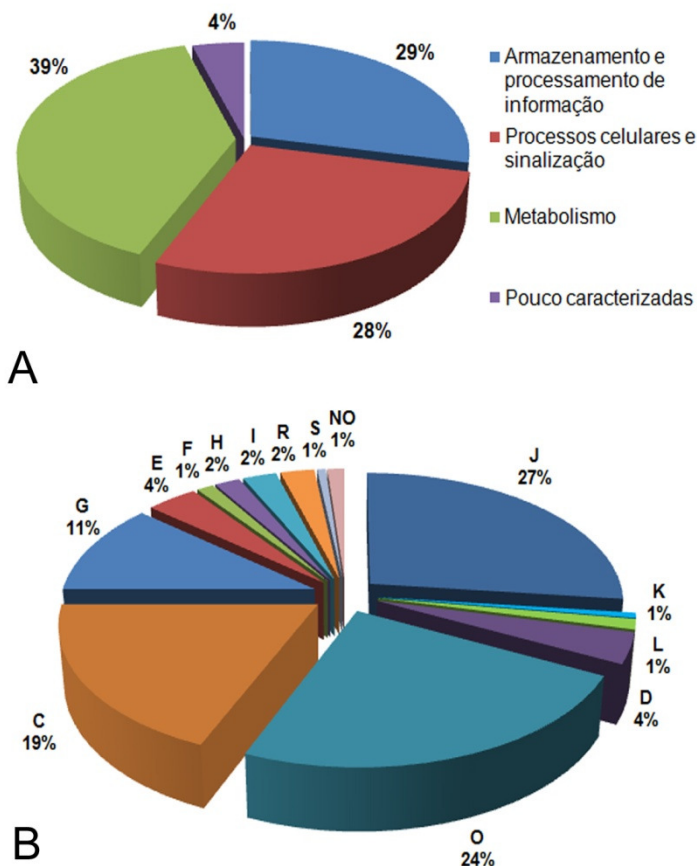


Figura 19: Classificação funcional das proteínas identificadas no proteoma do *M. synoviae*. (A) Distribuição das proteínas identificadas dentro das quatro grandes classes do COG. (B) Distribuição das proteínas identificadas dentro das categorias funcionais previstas pelo COG: (C) Produção e conversão de energia; (D) Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossomal; (E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) Transporte e metabolismo de carboidratos; (H) Transporte e metabolismo de coenzima; (I) Transporte e metabolismo de lipídeos; (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses; (K) Transcrição; (L) Replicação, recombinação e reparo; (NO) Não está no COG; (O) Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; (R) Somente função geral prevista; (S) Função desconhecida.

Tabela 8. Distribuição funcional das proteínas codificadas pelo genoma de *M. synoviae* e das identificadas no mapa bidimensional

Categories funcionais COGs	NCBI	Proteínas ID*
[J] Tradução, estrutura ribossomal e biogêneses	108	8
[K] Transcrição	19	1
[L] Replicação, recombinação e reparo	57	2
[D] Controle do ciclo celular, divisão celular e divisão cromossômica	4	1
[V] Mecanismo de defesa	11	0
[T] Mecanismo de transdução de sinal	6	0
[M] Parede celular/membrana/biogênese de envelope	10	0
[U] Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular	10	0
[O] Modificações pós-traducionais, <i>turnover</i> protéico e chaperonas	16	4
[C] Produção e conversão de energia	28	9
[G] Transporte e metabolismo de carboidratos	50	5
[E] Transporte e metabolismo de aminoácidos	33	3
[F] Transporte e metabolismo de nucleotídeos	23	1
[H] Transporte e metabolismo de coenzima	10	2
[I] Transporte e metabolismo de lipídeos	8	1
[P] Transporte e metabolismo de íon inorgânico	24	0
[Q] Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundário	2	0
[R] Somente função geral predita	55	2
[S] Função desconhecida	31	1
NO - Não está no COG	189	2

ID*: Identificadas

4.4.1 Armazenamento e processamento de informação

Neste grupo funcional foram identificadas onze proteínas, dentre elas o fator de alongação Ts, o fator de alongação Tu, o fator de alongação G, a lisil-RNAt sintetase, a prolil-RNAt sintetase, a proteína ribossomal L9 50S, a proteína ribossomal L1 50S, a proteína ribossomal L3 50S, a proteína SSB, a DNA polimerase III(subunidade beta), e a proteína GreA.

Neste grupo foram encontrados componentes fundamentais da tradução protéica. Encontramos fatores de alongação essenciais à biossíntese protéica em procariotos. O fator de alongação Tu, que inicia a alongação, pois é responsável pela ligação dos aminoacil-RNAt ao complexo do ribossomo e ao RNAm. O fator de alongação G, responsável pela segunda etapa da alongação, transloca o RNAt e RNAm nos sítios do ribossomo, e o fator de alongação Ts que recicla o

fator de alongação Tu na forma ativa de ligação a aminoacil-RNAt (NYBORG, 1998). Também encontramos duas aminoacil-RNAt-sintetases, responsáveis na formação dos aminoacil-RNAt e proteínas da subunidade 50S do ribossomo.

Segundo Jayasekera e colaboradores (2005), a importância dos fatores de alongação procarióticos na maquinaria da tradução e a falta de homologia com os fatores eucarióticos, os tornam alvos potenciais a inibidores bacterianos. Um desses fatores de alongação, o EF-Tu é uma das proteínas imunogênicas de *M. hyopneumoniae* (PINTO et al., 2007).

Algumas proteínas essenciais à replicação foram identificadas, como a proteína SSB e a DNA polimerase III (subunidade beta). Essa última enzima tem papel central na replicação do DNA de micoplasmas e muito semelhante à DNA pol III de eubactérias gram-positivas (WASINGER et al., 2000). Também identificamos a proteína GreA que é um fator de alongação da transcrição. De acordo com Stepanova e colaboradores (2007), os fatores Gre possuem grande importância biológica, visto que os genes *gre* são encontrados na maioria das bactérias. O gene *greA* está entre os 200 genes essenciais para a viabilidade de *M. pneumoniae* (STEPANOVA et al., 2007)

4.4.2 Processos celulares e sinalização

Neste grupo funcional foram identificadas cinco proteínas, sendo elas a proteína de divisão celular FtsZ, a chaperona DnaK, a tiol peroxidase, a tioredoxina redutase e o fator trigger.

A principal proteína envolvida na divisão celular na maioria dos procariotos foi identificada no presente proteoma, a proteína Ftsz. O gene *ftsZ* é amplamente conservado e encontrado em uma variedade de bactérias, inclusive em micoplasmas (SRINIVASAN et al., 2007).

Algumas das mais abundantes proteínas expressas no proteoma do *M. synoviae* são chaperonas e proteínas de choque térmico, os principais sistemas citoplasmáticos de chaperonas em procariotos são DnaK/DnaJ/GrpE e GroES/GroEL (MUSATOVOVA et al., 2006). Durante a infecção os micoplasmas encontram diversas condições ambientais e a resposta imune do hospedeiro. Diante disso, eles precisam ter mecanismos de resposta a essas mudanças, para garantir a sua sobrevivência (MADSEN et al., 2006). As proteínas do choque térmico, como a DnaK, são essenciais ao crescimento e sobrevivência em condições adversas (WASINGER et al., 2000). O fator *trigger* está associado ao re-enovelamento de proteínas desnaturadas, é classificado como uma chaperona, mas não é uma proteína do choque térmico. Em

procariotos, o fator *trigger* está localizado na subunidade maior do ribossomo e pode ligar-se a polipeptídios nascentes (DEUERLING, et al., 2003).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas pelo sistema imune do hospedeiro para destruir bactérias patogênicas, por conseguinte, muitas bactérias produzem enzimas como catalases, superóxido dismutase e peroxidases, que são essenciais à defesa celular contra essas moléculas. As bactérias respondem à presença de espécies reativas de oxigênio aumentando a expressão dessas enzimas, assim, aumentando o sucesso da infecção (WOOD et al., 2003; ATACK et al., 2008).

A proteína tiol peroxidase (Tpx) é um tipo de peroxidase, também conhecida como peroxirredoxina (Prx), que é uma proteína antioxidante tiol peroxidase específica (WOOD et al., 2003). Essa proteína apareceu em múltiplas bandas no gel bidimensional, o que demonstra alto nível de expressão e modificações pós-traducionais. Os micoplasmas também produzem espécies reativas de oxigênio com o objetivo de provocar lesões na célula hospedeira. Desta maneira, essas proteínas podem desempenhar um papel importante na patogênese desses organismos. Todavia, para se proteger das próprias EROs, os micoplasmas utilizam o sistema de desintoxicação NADP⁺/tioredoxina, a fim de manter suas proteínas reduzidas (BEN-MENACHEM et al., 1997)

4.4.3 Metabolismo

Foram identificadas vinte e uma proteínas neste grupo funcional, sendo dezesseis proteínas citoplasmáticas: diidrolipoamida desidrogenase, acetato quinase, piruvato desidrogenase (alfa e beta), fosfotransacetilase, frutose-bifosfato aldolase, fosfoglicerato quinase, fosfopiruvato hidratase, fosfoglicerato mutase, gliceraldeído-3-P desidrogenase, leucil aminopeptidase, serina-hidroxi metil-transferase, ribonucleotideo-difosfato redutase (subunidade beta), proteína hipotética conservada MS53_0334, S-adenosilmetionina sintetase, e fosfodiesterase carregadora de grupo acil.

Devido a seu genoma pequeno, os micoplasmas não possuem muitos dos passos enzimáticos característicos na maioria das bactérias, como as etapas da síntese da parede celular, a síntese *de novo* de purinas, um ciclo do ácido tricarbóxico funcional e um sistema de transporte de elétrons mediado por citocromos, desta forma são organismos extremamente fastidiosos (DYBVIK e VOELKER, 1996).

Os micoplasmas possuem um mecanismo de conservação de ATP para contrapor a falta do ciclo do ácido cítrico, incluindo uma etapa conhecida como piruvato “roundhouse”. Essa etapa é uma alternativa para formação de oxaloacetato sem gasto de ATP, e a piruvato desidrogenase catalisa a primeira etapa do “roundhouse”, que é a conversão de piruvato a acetato (MATIC et al., 2003). Encontramos duas proteínas fundamentais ao metabolismo do acetato, a acetato quinase e a fosfoacetilase, sendo que ambas são encontradas em todos os organismos anaeróbicos (XU et al., 2005).

Cinco enzimas da via glicolítica foram identificadas, a frutose-bifosfato aldolase, a gliceraldeído-3-P desidrogenase, a fosfoglicerato quinase, a fosfoglicetato mutase e a fosfopiruvato hidratase também conhecida como enolase. Recentemente, tem sido proposto que quando exposta na superfície da célula, a enolase tem a capacidade de aumentar a virulência de alguns patógenos através da ligação ao plasminogênio. No *M. pneumoniae* (CHUMCHUA et al., 2008) e no *M. fermentans*, foi comprovado que a enolase, embora não seja considerada uma proteínas clássica de membrana, está presente na superfície celular e interage com o plasminogênio (YAVLOVICH et al., 2007).

A enzima leucil aminopeptidase é uma exopeptidase que catalisa a hidrólise de resíduos de leucina do extremo amino terminal de proteínas ou peptídeos. Ela desempenha várias funções biológicas em diversos organismos, como degradação de peptídeos ativos ou interação com peptídeos dependentes de sinalização e com o DNA. As aminopeptidases estão despertando grande interesse visto que estão envolvidas em doenças como o câncer e na patogenicidade de alguns organismos, como o *Plasmodium falciparum* (HUANG et al., 2009; JIA et al., 2009). A segunda proteína do metabolismo de aminoácidos identificada, a serina-hidroximetil-transferase, também vem sendo associada como um possível alvo antitumoral, antibacteriano e antimalárico, devido a sua função no ciclo desoxitimidilato (MAENPUEN et al., 2009).

Identificamos uma proteína envolvida no metabolismo de nucleotídeos, a ribonucleotídeo-difosfato redutase (NrdF). Ultimamente, a enzima NrdF vem sendo estudada como um potente antígeno protetor contra o *M. hyopneumoniae* (CHEN et al., 2006).

A S-adenosil metionina (SAM) é um cofator enzimático envolvido na transferência de metila ao DNA, RNA, proteínas e pequenas moléculas. A biossíntese do SAM envolve a condensação de ATP e L-metionina catalisada pela S-adenosilmetionina sintetase (também conhecida como metionina-adenosil transferase), a qual foi

identifica no proteoma do *M. synoviae*. Alterações na abundância dessa enzima provocam desordens celulares, portanto, a S-adenosilmetionina sintetase torna-se um alvo terapêutico no desenvolvimento de inibidores. Recentemente, foi proposto como possível alvo antiparasitário (TAYLOR et al., 2009).

A fosfodiesterase carregadora de grupo acil (ACP) é uma proteína envolvida no metabolismo de lipídeos, ela converte a holo proteína (ACP) em apoACP, forma inativa, pela hidrólise do fosfodiéster ligado entre a ACP e o grupo prostético 4'-fosfopantoteína. A maioria das fosfodiesterases estudadas tem pequenas moléculas como substrato. A fosfodiesterase carregadora de grupo acil é a única enzima que cliva a ligação protéica fosfodiéster (THOMAS et al., 2007). Recentemente, a fosfodiesterase carregadora de grupo acil foi identificada como uma proteína antigênica na pleuropneumonia contagiosa bovina causada pelo *M. mycoides*, sendo considerada uma proteína candidata para métodos de diagnóstico (NASEEM et al., 2009).

4.4.4 Proteínas pouco caracterizadas

Os avanços na análise genômica permitiram a conclusão da anotação do genoma de muitos organismos. Contudo, a maioria das ORFs identificadas são catalogadas como proteínas hipotéticas conservadas ou proteínas hipotéticas (ROBERTS, 2006). Segundo Regula e colaboradores (2000), dezenas de genomas bacterianos têm sido sequenciados e publicados, porém, somente entre 50 e 70% das ORFs podem ser classificadas em alguma classe funcional. Por exemplo, no genoma do *M. pneumoniae*, mesmo sendo um genoma pequeno, somente 67% das suas ORFs são atribuídas a proteínas com função conhecida.

De acordo com o genoma do *M. synoviae*, aproximadamente 33% das CDSs são consideradas proteínas hipotéticas conservadas ou proteínas hipotéticas (VASCONCELOS et al., 2005). Por outro lado, a classificação protéica de acordo com o COG determina que 39,6% das proteínas são pouco caracterizadas. Neste estudo encontramos um total de quatro proteínas hipotéticas, uma proteína hipotética conservada e uma NADH oxidase cujo a classificação funcional foi baseada em predição teóricas.

Com o objetivo de esclarecer a possível identidade das proteínas hipotéticas identificadas por MALDI-TOF, as sequências protéicas foram confrontadas com banco de dados. Para isso, realizaram-se buscas utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local*

Alignment Search Tool) no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contra bancos de dados de seqüências de proteínas não redundantes.

Na proteína hipotética MS53_0538 (gi/71894549) foi encontrado o domínio PEBP (*PhosphatidylEthanolamine-Binding Protein*) que pertence a uma família de proteínas de ligação a fosfolipídios altamente conservada em uma variedade de organismos. A comparação da seqüência protéica encontrou 47% de identidade com a proteína de ligação a fosfolipídios do *M. gallisepticum* R.

Na proteína hipotética MS53_0115 (gi/71894239) foi encontrado o domínio pertencente à família LemA. Essas proteínas contêm uma região amino terminal predita como transmembranar com terminação extracelular. A comparação da seqüência da proteína encontrou 53% de identidade com a proteína hipotética MHJ_0326 do *M. hyopneumoniae* J e a proteína hipotética MHP347 do *M. hyopneumoniae* 232.

Encontramos o domínio DUF2130 na proteína hipotética MS53_0491 (gi/71894503). Esse domínio é encontrado em várias proteínas hipotéticas de procariotos, mas sua função ainda é desconhecida. A comparação da seqüência da proteína MS53_0491 como o banco de dados encontrou 34% de identidade com uma proteína hipotética de *M. penetrans* HF-2, a MYPE8680.

A quarta proteína hipotética encontrada, a proteína hipotética MS53_0598, não contém domínio conservado conhecido. A proteína com maior proximidade na seqüência foi a TCP1 de *Saccharomyces cerevisiae*, com 29% de identidade. A proteína chaperonina contendo TCP1 mantém o equilíbrio do enovelamento de proteínas no citosol de eucariotos por auxiliar na biogênese de muitas proteínas, tais como, actinas, tubulinas e proteínas reguladoras do ciclo celular (STIRLING et al., 2007). Segundo Plath e Rapoport (2000), uma proteína homóloga à TCP1 em procariotos é a chaperonina GroEL. Em *E. coli* a GroEL compartilha aproximadamente 18% de identidade com a TCP1 (URSIC et al., 1994).

O estudo proteômico do *M. penetrans* revelou a presença de 27 proteínas consideradas hipotéticas, já no proteoma do *M. genitalium* foram encontradas 17 proteínas hipotéticas (FERRER-NAVARO et al., 2006; WASINGER et al., 2000). Portanto, a confirmação da expressão de proteínas hipotéticas em mapas proteômicos confere validade à predição de suas seqüências anotadas no genoma e sugere que essas proteínas são funcionais e essenciais a célula.

4.5 Proteínas Imunogênicas

No intuito de identificar proteínas antigênicas do *M. synoviae* foi realizada uma análise por *immunoblot* das proteínas resolvidas nos géis bidimensionais utilizando o soro de frango imunizado. Portanto, assim poderíamos diferenciar das proteínas isoladas quais estariam provavelmente envolvidas na patogenicidade, e quais seriam possíveis candidatas ao aperfeiçoamento de diagnósticos e a fabricação de possíveis vacinas.

Na etapa de padronização do *immunoblot* optou-se por utilizar as concentrações de 1:1000 para os soros (o soro de frango imunizado com *M. synoviae* e o soro de frango não imunizado/SPF) e 1:15000 para o anticorpo secundário em função dos melhores resultados obtidos nos experimentos preliminares.

Desta forma, realizamos a separação protéica do extrato celular total de *M. synoviae* solúvel em CHAPS em géis bidimensionais de 7 cm com uma faixa de pH de 3-10. O mapa protéico revelou aproximadamente 150 bandas de proteínas coradas com azul de Coomassie G-250. O mapa protéico foi repetido em dois experimentos independentes mostrando alta reprodutibilidade (Figura 20).

O total de proteínas solúveis do *M. synoviae* resolvidas por eletroforese bidimensional foi transferido para membranas de PVDF e analisadas por *immunoblot*. O imunoproteoma foi realizado com soro de animais fortemente imunizados e com soro de animais não imunizados (SPF). Em ambos casos, o *immunoblot* apresentou reação imunogênica com diversas proteínas do mapa proteômico. As bandas de proteínas reconhecidas na reação estão distribuídos por todo o mapa proteômico: são proteínas de alta e baixa massa molecular, bem como com uma ampla faixa de *pI* (Figura 21).

Através da análise comparativa dos dois imunoproteomas foi possível detectar aproximadamente 26 bandas de proteínas reconhecidas somente pelo soro de animais imunizados. A maioria das proteínas se concentra na região de massa molecular menor que 45 kDa e *pI* entre 6-8.

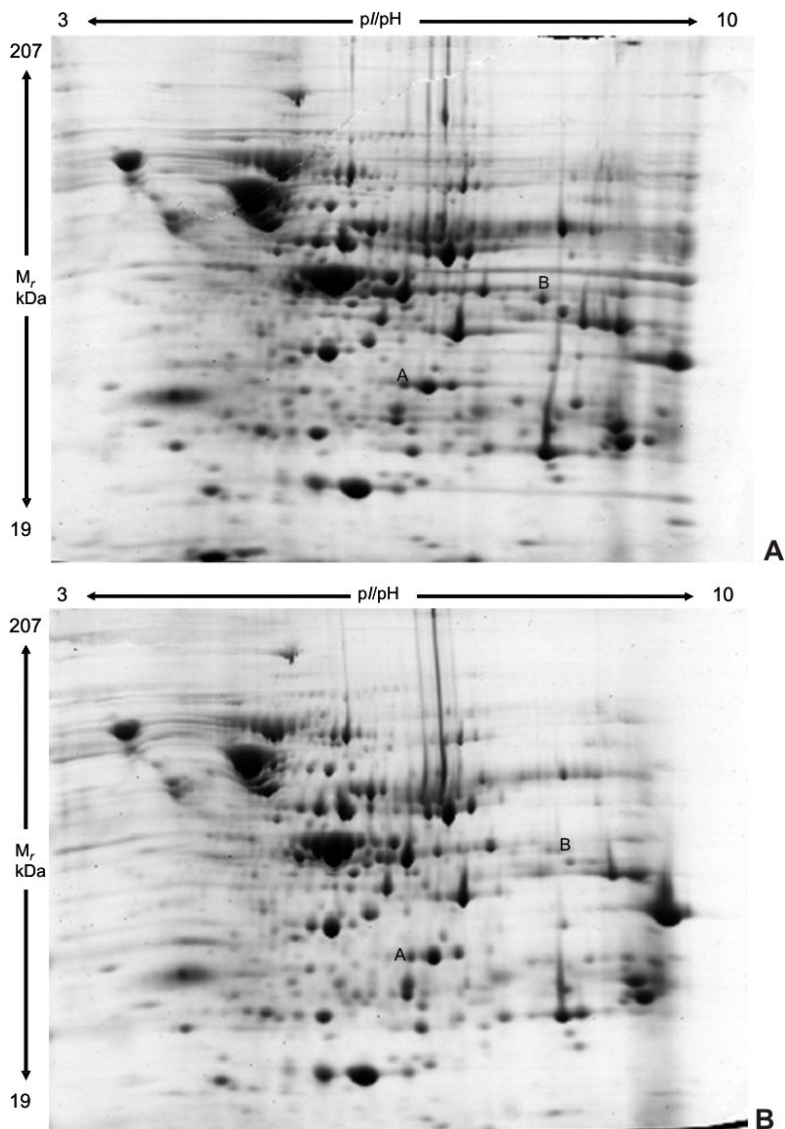


Figura 20. Mapa bidimensional da fração protéica solúvel em CHAPS de *M. synoviae*. (A e B são géis em duplicatas) O extrato total protéico solúvel em CHAPS (70 μ g) foi separado em *strip* de 7 cm (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel 12% e corado com CBB G-250. As bandas assinaladas de A e B correspondem às proteínas identificadas.

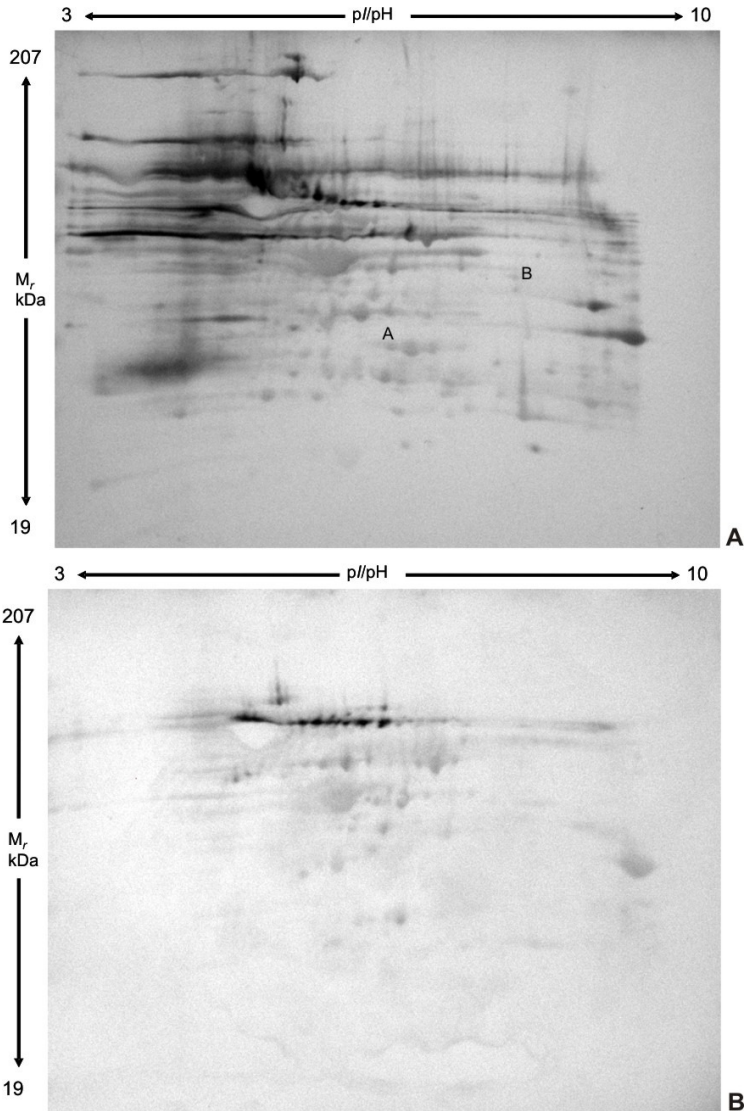


Figura 21. Identificação das proteínas imunogênicas da fração protéica solúvel em CHAPS de *M. synoviae*. As proteínas resolvidas por 2DE foram transferidas à membrana de PVDF, e analisada por *immunoblot* com (A) soro de frango imunizado com *M. synoviae* e (B) com soro de frangos não imunizado. As bandas assinaladas de A e B correspondem às proteínas identificadas.

Baseado no resultado do *immunoblot*, as bandas que reagiram somente no soro de animais imunizados foram retirados do gel bidimensional e analisados por espectrometria de MALDI-TOF. As 26 bandas identificadas como proteínas imunogênicas exclusivas do soro de animais imunizados foram analisados em duplicata, o que corresponde a 52 bandas. No entanto, somente duas bandas das 26 foram identificadas com confiabilidade de $p < 0,05$. Das demais bandas analisadas, 28 foram identificadas com *score* abaixo de $p < 0,05$ e das 22 restantes não obtivemos espectros.

As proteínas identificadas como imunogênicas são a frutose-bifosfato aldolase e a proteína hipotética MS_0025 (tabela 9). A frutose-bifosfato aldolase foi identificada no proteoma inicial do *M. synoviae*, item 4.4.3 Metabolismo. Entretanto, a proteína hipotética MS_0025 somente foi identificada no gel realizado nos experimentos do *immunoblot*. Essa proteína pertence à categoria funcional Função Geral Predita segundo o COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 9: Proteínas do *M. synoviae* que reagiram em *immunoblot* de soro de animais infectados identificadas por MS.

<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>pI/Mr</i> <i>Teórico</i>	<i>pI/Mr</i> <i>Observado</i>	<i>MASCOT</i> <i>Score</i>
A	Frutose bifosfato aldolase	6,27/31275	6,79/35311	56
B	Proteína hipotética MS_0025	7,64/39702	8,34/50092	60

Através da análise por BLAST (no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) da proteína hipotética MS_0025 (gi/71894050) contra bancos de dados de sequências de proteínas não redundantes foi identificado que ela possui um domínio fosfodiesterase (PTE), que catalisa a hidrólise de compostos organofosforados. A comparação da sequência protéica encontrou 80% de identidade com a proteína hipotética MAG_6390 de *M. agalactiae* PG2, um patógeno de ruminantes, que também possui um domínio fosfodiesterase.

Para determinar se a proteína hipotética MS_0025 é uma proteína imunogênica específica entre micoplasmas de aves foi realizada uma pesquisa utilizando a ferramenta BLAST e as sequências genômicas do *M. gallisepticum*, do *M. iowae* e *M. meleagridis*.

A proteína hipotética MS_0025 apresentou 41% de identidade com a proteína ATPase do *M. gallisepticum*. No genoma do *M. meleagridis*, a proteína hipotética MS_0025 apresentou 33% de identidade com a proteína RNA polimerase subunidade beta. No *M. iowae*, essa proteína apresentou 42% de identidade com a proteína espécie 1. Esses resultados indicam que a proteína hipotética MS_0025 não pode ser considerada uma proteína imunogênica espécie-específica.

Recentemente, Jores e colaboradores (2009) realizaram o imunoproteoma do *M. mycoides* (MmmSC) e encontraram 37 proteínas imunogênicas. O grupo realizou a análise *in silico* das proteínas para investigar proteínas espécie-específicas, comparando com o genoma de outras três espécies de micoplasmas de ruminantes e concluíram que a maioria delas tem homologia com proteínas de espécies relacionadas ao *M. mycoides*.

A comparação *in silico* da proteína frutose-bifosfato aldolase contra todas as sequências disponíveis no NCBI, bem como contra as sequências do *M. gallisepticum*, do *M. iowae* e *M. meleagridis* revelou que esta proteína é altamente conservada.

Ainda segundo Jores e colaboradores (2009), obviamente o ideal seria incluir proteínas imunogênicas espécie-específicas no desenvolvimento de novos diagnósticos, para garantir o máximo de especificidade. No entanto, antígenos que são encontrados em *cluster* de espécies relacionadas podem fornecer métodos de diagnóstico confiáveis a outras doenças causadas por patógenos intimamente relacionados. No caso do *M. synoviae*, a reatividade cruzada com soro de aves infectadas com outros patógenos seria muito útil, pois tem sido relatado o sinergismo do *M. synoviae* com outros importantes patógenos de aves (NARAT et al., 1998). Por exemplo, o sinergismo entre *Escherichia coli*, *M. gallisepticum* e *M. meleagridis* (STIPKOVITS e KEMPF, 1996).

Bercic e colaboradores (2008) recentemente identificaram, por *immunoblot* e sequenciamento do N-terminal, 17 proteínas do *M. synoviae*, das quais seis foram consideradas imunogênicas: denominadas P70, P72, P82, P90, P110 e P160. As demais proteínas identificadas pelo grupo estão envolvidas no metabolismo e processos celulares.

A análise de proteínas imunogênicas de outras espécies de *Mycoplasma* através da combinação da eletroforese bidimensional e *immunoblot* revelaram diversas proteínas com potencial biotecnológico. O imunoproteoma do *M. hyopneumoniae* identificou cinco proteínas antigênicas, HSP70, EF-Tu, PDHB, p76 e p46 (PINTO et al., 2007). O proteoma do *M. mycoides* identificou 37 proteínas antigênicas, sendo que

uma delas a proteína frutose-bifosfato aldolase, que também foi identificada neste trabalho (JORES et al., 2009).

As proteínas identificadas como imunogênicas nesse trabalho, bem como a maioria do estudo do *M. hyopneumoniae* e do *M. mycoide*, são proteínas citoplasmáticas. Segundo Pinto e colaboradores (2007), a indução da resposta imune contra essas proteínas somente poderia ocorrer após a sua liberação durante a infecção, devido à morte do patógeno. Contudo, a localização dessas proteínas na superfície celular não poderia ser descartada. Recentemente, foi descrito que a enolase do *M. fermentans*, uma proteína chave da glicólise, também se encontra localizada na superfície celular e está envolvida na ligação do plasminogênio a célula do *Mycoplasma* (YAVLOVICH et al., 2007).

De acordo com Bercic e colaboradores (2007), os anticorpos contra a enolase bacteriana podem reagir com a enolase do hospedeiro, devido à alta homologia entre as proteínas, assim seria possível que a resposta imune contra a enolase do *M. synoviae* desencadeie um processo autoimune no hospedeiro.

Outras proteínas comumente encontradas no citoplasma também foram identificadas na superfície celular do *M. pneumoniae*, sendo elas o fator de alongação Tu e a piruvato desidrogenase subunidade beta. Além de desempenharem suas funções em processos biossintéticos e metabólicos, podem ser translocadas à superfície e auxiliar na aderência do patógeno (DALLO et al., 2002). Segundo Dallo e colaboradores (2002), o fator de alongação Tu foi descrito em diversos estudos bacterianos como uma proteína antigênica e com localização na superfície celular.

A hemaglutinina VIhA é uma abundante lipoproteína na superfície do *M. synoviae* e um antígeno imunodominante. A clivagem pós-traducional da VIhA gera duas lipoproteínas a MSPA e a MSPB altamente imunogênicas (LAVRIC et al., 2007). Em nossa análise do proteoma do *M. synoviae* por *immunoblot* não identificamos nenhuma lipoproteína com $p < 0,05$. Esse dado confirma os resultados encontrados no imunoproteoma do *M. mycoides*. De acordo com Jores e colaboradores (2009), a ausência de identificação de lipoproteína em seu estudo seria deve-se ao fato de que são proteínas pequenas e não possuem âncora na membrana, assim elas podem ser perdidas durante a preparação da amostra.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho realizou-se a primeira análise proteômica do *M. synoviae*, através da associação das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Entre os métodos de extração testados para a separação protéica, o método de extração com o detergente CHAPS produziu os melhores resultados, com melhor resolução e reprodutibilidade. Como já era esperado, os géis bidimensionais maiores apresentaram melhor resolução e separação protéica. Por meio dos géis de 7 cm com faixa de pH 3-10 foi possível resolver entre 100 a 150 bandas por gel e em géis de 13 cm com faixa de pH 3-10 foi possível resolver entre 250 a 300 bandas, corados com azul de Coomassie G-250. A separação protéica pelos géis bidimensionais demonstrou que ocorre um predomínio de proteínas com *pI* entre 4-7 e com massa molecular entre 18 a 80 kDa.

A técnica de 2DE-MS foi adequada para identificação de um pequeno grupo de proteínas, tornando-se necessário aprimorar o método para obter um mapa protéico mais representativo. A associação das duas técnicas permitiu a identificação de 160 bandas, correspondendo a 42 proteínas diferentes. As proteínas mais proeminentes foram a DnaK, o fator de alongação Tu e a tiol peroxidase, as quais apresentaram várias bandas com diferenças no *pI* e/ou *Mw*, indicando a presença de modificações pós-traducionais. Algumas proteínas hipotéticas tiveram sua existência confirmada nesse estudo. A maioria das proteínas identificadas pertence às classes funcionais de metabolismo e estocagem e processamento da informação.

A combinação da técnica de eletroforese bidimensional, de *immunoblot* e de espectrometria de massa possibilitou a identificação de duas proteínas imunogênicas, a frutose-bifosfato aldolase e a proteína hipotética MS_0025.

Por fim, espera-se que o mapa proteômico preliminar proveniente deste estudo torne-se importante instrumento para futuros estudos da biologia do *M. synoviae*, da interação hospedeiro-patógeno e desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, bem como de formas preventivas das patologias provocadas por este organismo.

6. PERSPECTIVAS

As perspectivas do presente trabalho envolvem a continuidade das análises do imunoproteoma, através de novos métodos de detecção protéica, como a marcação fluorescente, bem como aperfeiçoar a metodologia de identificação protéica através da espectrometria de massa por MALDI-TOF ou da combinação do LC-MS/MS.

Com o mapa proteômico do *M. synoviae* disponível será possível, com o uso de marcadores fluorescente, realizar a análise do fosfoproteoma e glicoproteoma do *M. synoviae*, tendo em vista que muitas proteínas encontradas neste estudo como em outros proteomas apresentam grande variações no *pI* e/ou *Mw*, que podem ser decorrentes de modificações pós-traducionais.

Através dos resultados obtidos com a análise do imunoproteoma, será possível realizar estudos funcionais de proteínas importantes na patogenicidade, bem como realizar buscas por moléculas com potencial inibidor de proteínas do *M. synoviae*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R. Quantitative Proteome Analysis: Methods and Applications. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. S315–320, 2003.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

ALLEN, J. L.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F. The *vlhA* loci of *Mycoplasma synoviae* are confined to a restricted region of the genome. **Microbiology**, v. 151, p. 935–940, 2005.

ANDY, L.T.Y.; QUING-YU, E.H.; JEN-FU, C. Proteomic technology and its biomedical application. **Acta Biochi Biophys Sin**, v. 35, p. 965-975, 2003.

ARRAES, F. B. M.; CARVALHO, M. J. A.; MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M.; PEDROSA, F. O.; FELIPE, M. S. Differential metabolism of *Mycoplasma* species as revealed by their genomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.1, p. 182-189, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS (ABEF). **Relatório anual 2008/2009**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/relatórios_anuais>. Acesso em: 22 dezembro 2009.

ATAACK, J. M.; HARVEY, P.; JONES, M. A.; KELLY, D. J. The *Campylobacter jejuni* thiol peroxidases Tpx and Bcp both contribute to aerotolerance and peroxide-mediated stress resistance but have distinct substrate specificities. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 15, p. 5279-5290, 2008.

BAILÃO, A. M.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. de A. Kinases of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*: An overview. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.1, p. 219-224, 2007.

BASEMAM, J. B.; TULLY, J. G. *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 21-32, 1997.

BENCINA, D.; NARAT, M.; DOVC, P.; DROBNIC-VALIC, M.; HABE, F.; KLEVEN, S. H. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 85-94, 1999.

BEN-MENACHEM, G.; HIMMELREICH, R.; HERRMANN, R.; AHARONOWITZ, Y.; ROTTEM, S. The thioredoxin reductase system of mycoplasmas. **Microbiology**, v. 143, n. 6, p. 1933-1940, 1997.

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.

BICH, C.; ZENOBI, R. Mass spectrometry of large complexes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, p. 632-639, 2009.

BOONJAKUAKUL, J.; GERNS, H. L.; CHEN, Y. T.; HICKS, L. D.; MINNICK, M. F.; DIXON, S. E.; HALL, S. C.; KOEHLER, J. E. Proteomic and Immunoblot Analyses of *Bartonella quintana* Total Membrane Proteins Identify Antigens Recognized by Sera from Infected Patients. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2548-2561, 2007.

BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. de A. Identification of the GTPase superfamily in *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.1, p. 212-218, 2007.

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

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BANDOW, E. J.; LABISCHINSKI, H. Bacterial proteomics and its role in antibacterial drugs discovery. **Mass Spec. Rev.**, v. 24, p. 549-565, 2005.

BUIM, R. M.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, P. J. A. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 7, p. 552-556, 2009.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p.1-22, 2001.

CAMACHO-CARVAJAL, M. M.; WOLLSCHIED, B.; AEBERSOLD R.; STEIMLE, V.; SCHAMEL, W. W. A. Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, p. 176-182, 2004.

CAMARGO, E. L. O. **Análise proteômica da região cambial de árvores adultas de *Eucalyptus grandis***. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

CAÑAS, B.; PIÑEIRO, C.; CALVO, E.; LÓPEZ-FERRER, D.; J. M. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. **Journal of Chromatography B**, v. 1153, p. 235-258, 2007.

CANTÚ, D, M. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita do citros**. Tese de doutorado em Ciências, Universidade Federal de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2007.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M de.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z. Monitoria Sorológica Da Micoplasmose em Plantéis de Aves Reprodutoras no Brasil Através do Teste de Soroaglutinação Rápida. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.1, p.23-26, jan./mar., 2006.

CARVALHO, F. M.; FONSECA, M. M.; MEDEIROS, S. B. de; SCORTECCI, K. C.; BLANA, C. A. G.; AGNEZ-LIMA, L. F. DNA repair in reduced genome: The *Mycoplasma* model. **Gene**, n. 360, p. 111-119, 2005.

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

CASH, P. Proteomics in the study of the molecular taxonomy and epidemiology of bacterial pathogens. **Electrophoresis**, v. 30, p. S133-141, 2009.

CELEDÓN, P. A. F. **Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa**. Tese de doutorado em Agronomia, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 493-499, 1999.

CHAVES D. F. S. **ANÁLISE PROTEÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM, *nrC*- e *nifA*- DE *Herbaspirillum seropedicae***. Dissertação Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CHAVES, D. F. S.; FERRER, P. P.; SOUZA, E. M.; GRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, v. 7, p. 3759-3763, 2007.

CHEN, C. H. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, p. 16-36, 2008.

CHOE, L. H.; WERNER, B. G.; LEE, K. H. Two-dimensional Protein Electrophoresis: From molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders. **The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 3, p. 327-335, 2006.

CHU, P.W.; YAP, M. N.; WU, C. Y.; HUANG, C. M.; PAN, F. M.; TSENG, M. J.; CHEN, S. T. A proteomic analysis of secreted proteins from xylan-induced *Bacillus sp.* strain K-1. **Electrophoresis**, n. 21, p.1740-1745, 2000.

CHUMCHUA, V.; PORNPUTTAPONG, N.; THAMMARONGTHAM, C.; MEKSURIYEN, D. Homology modeling of *Mycoplasma pneumoniae* enolase and its molecular interaction with human plasminogen. **Bioinformation**, v. 3, n. 1, p. 18-23, 2008.

CIERO, L. D.; BELLATO, C. M.; MEINHARDT, L. W.; FERRARI, F.; CASTELLARI, R. R.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Assessment of four different detergents used to extract membrane proteins from *Xylella fastidiosa* by two-dimensional electrophoresis. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 269-274, 2004.

CONGLI, Y.; XIAOWEI, Y.; ZHIBIAO, Y.; NINGYU, Z.; SHENBO, Z.; PEIXING, H.; XIAOFENG, G.; CHENGRONG, Y.; CONGBIN, Y.; JIANGUO Z.; LI, C.; XIUGUO, H. Proteomic study of *Mycoplasma suis* using the gel-based shotgun strategy. **Vet. Microbiol.**, 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2009.10.022

DALLO, S. F.; KANNAN, T. R.; BLAYLOCK, M. W.; BASEMAN, J. B. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1041–1051, 2002.

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B. **Infecções Bacterianas e Micóticas**. São Paulo: Ed. ART, 1973.

DAVIS, K. L.; WISE, K. S. Site-specific proteolysis of the MALP-404 lipoprotein determines the release of a soluble selective and alteration of the surface phenotype of *Mycoplasma fermentans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p.1129-1135, Mar. 2002.

DEMINA, I. A.; SEREBRYAKOVA, M. V.; LADYGINA, V. G.; ROGOVA, M. A.; ZGODA, V. G.; KORZHENEVSKIYI, D. A.; GOVORUN, V. M. Proteome of the bacterium *Mycoplasma gallisepticum*. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 2, p. 165-174, 2009.

DEUERLING, E.; PATZELT, H.; VORDERWÜLBECKE, S.; RAUCH, T.; KRAMER, G.; SCHAFFITZEL, E.; MOGK, A.; SCHULZE-SPECKING, A.; LANGEN, H.; BUKAU, B. Trigger Factor

and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1317-1328, 2003.

DONE, S.H. Enzootic pneumonia (Mycoplasmosis) revisited. **Pig Journal**, v.38, p.40-61, 1996.

DUSANIC, D.; BERCIC, R. L.; CIZELJ, I.; SALMIC, S.; NARAT, M.; BENCINA, D. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vivo. **Vet. Microbiol.**, v. 138, p. 114-119, 2009.

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

DYBVIG, K.; ZUHUA, C.; LAI, P.; JORDAN, D. S.; FRENCH, T.; TU, A. H. T.; LORAINÉ, A. E. Genome of *Mycoplasma arthritidis*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4000-4008, 2008.

FERRER-NAVARRO, M.; GÓMEZ, A.; YANES, O.; PLANELL, R.; AVILÉS, F. X.; PIÑOL, J.; PÉREZ PONS, J. A.; QUEROL, E. Proteome of the bacterium *Mycoplasma penetrans*. **J. Proteome Res.**, v. 5, n. 3 p. 688-694, 2006.

FIorentin, L.; MORES, MAZ.; TREVISOL, I. M.; ANTUNES, S. C.; COSTA, J. L. A.; SONCINI, R. A.; VIEIRA, N. D. Test Profiles of Broiler Breeder Flocks Housed in Farms with Endemic *Mycoplasma synoviae* Infection. **Brazilian J. Poultry Sci.**, v. 5, n. 1, p.37-43, 2003.

FONSECA, M. M.; ALARCON, F. J. B.; VASCONCELOS, A. T. de; AGNEZ-LIMA, L. F. A model for the RecA protein of *Mycoplasma synoviae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 290-295, 2007.

GALVANI, M.; HAMDAN, M.; RIGHETTI, P. G. Investigating the reaction of a number of gel electrophoresis cross-linker with β -lactoglobulin by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3684-3692, 2000.

GAUTIER-BOUCHARDON, A. V.; REINHARDT, A. K.; KOBISCH, M.; KEMPF, I. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma*

gallisepticum, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. **Vet. Microbiol.**, v. 88, n. 1, p. 47-58, 2002.

GOLINELLI, L. P. **Análise proteômica do soro do colostro e leite Maduro bovino (bos taurus)**. Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GONÇALVES, P. M. R. **Escherichia coli Com Detecção do Gene iss por PCR, Micoplasmas e Salmonelas na Qualidade Sanitária de Frangos de Corte ao Abate** Tese doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ 2005.

GÖRG, A.; **2-D Electrophoresis: Principles and Method**. GE Healthcare, 2004. 168 p.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004

GRAHAM, R. L. J.; GRAHAM, C.; MCMULLAN, G. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. **Microbial Cell Factories**, v.6, n. 26, 2007.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, n.66, p.39-63, 2002.

GRIFFITHS, W. J.; JONSSON, A. P.; LIU, S.; RAI, D. K.; WANG, Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. **Biochem. J.**, v. 355, p. 545-561, 2001.

GYGI, S.P. AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, n. 4, v. 5, p. 489-494, 2000.

HALBEDEL, S.; EILERS, H.; JONAS, B.; HECKER, J. B. M.; ENGELMANN, S. STÜLKE, J. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: Analysis of the promoters of the *ackA* e *Idh* genes. **Journal Molecular Biology**, n. 371, p. 596-607, 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.

HOLLUNG, K.; VEISETH, E.; JIA, X.; FARGESTAD, E. M.; HILDRUM, K. I. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science**, n. 77, p. 97-104, 2007.

HUANG, H.; TANAKA, H.; HAMMOCK, B. D.; MORISSEAU, C. Novel and highly sensitive fluorescent assay for leucine aminopeptidases. **Analytical Biochemistry**, v. 391, p. 11–16, 2009

JAYASEKERA, M. K.; ONHEIBER, K.; KEITH, J.; VENKATESAN, H.; SANTILLAN, A.; STOCKING, E. M.; TANG, L.; MILLER, J.; GOMEZ, L.; RHEAD, B.; DELCAMP, T.; HUANG, S.; WOLIN, R.; BOBKOVA, E. V.; SHAW, K. J. Identification of Novel Inhibitors of Bacterial Translation Elongation Factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 131-136, 2005.

JEFFERY, N.; GASSER, R. B.; STEER, P. S.; NOORMOHAMMADI, A. H. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. **Microbiology**, v. 153, p. 2679-2688, 2007.

JIA, H.; TERKAWI, M. A.; ABOGE, G. O.; GOO, Y. K.; LUO, Y.; LI, Y.; YAMAGISHI, J.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. Characterization of a leucine aminopeptidase of *Babesia gibsoni*. **Parasitology**, v. 136, p. 945–952, 2009.

JOCELYN, H.; ILAG, L. Dividing and conquering proteomics. **Proteomics**, p.96-98, 2002.

JORES, J.; MEENS, J.; BUETTNER, F. F. R.; LINZ, B.; NAESSENS, J.; GERLACH, G. F. Analysis of the immunoproteome of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type reveals immunogenic homologues to other known virulence traits in related *Mycoplasma*

species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 131, p. 238–245, 2009.

KAHANE, I.; RAZIN, S. Immunological analysis of micoplasma membranes. **Journal Bacteriology**, v.100, p.187-194, 1969.

KERY, V.; SAVAGE, J. R.; WIDJAJA, K.; BLAKE, K.; CONKLIN, D. R.; HO, Y. J.; LONG, X.; RECHENBERG, M. V.; ZAREMBINSKI, T. I.; BONIFACE, J. J. Expression screen by enzyme-linked immunofiltration assay designed for high-throughput purification of affinity-tagged proteins. **Analytical Biochemistry**, n.317, p. 255-258, 2003.

KUSILUKA, L. J. M.; KOKOTOVIC, B.; OJENIYI, B.; FRIIS, N. F.; AHRENS, P. Genetic variations *Mycoplasma bovis* strain isolated from Danish cattle. **FEMS Microbiology Letters**, n. 192, p. 113-118, 2007.

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-1 β in chicken macrophages. **Veterinary Microbiology**, 121, p. 278-287, 2007.

LAVRIC, M.; MAUGHAN, M. N.; BLISS, T. W.; DOHMS, J. E.; BENCINA, D.; KEELER JR, C. L; NARAT, M. Gene expression modulation in chicken macrophages exposed to *Mycoplasma synoviae* or *Escherichia coli*. **Vet. Microbiol.**, v. 126, p. 111-121, 2008.

LEFKOVITS, I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal. **Journal of Chromatography B**, v. 787, p. 1-10, 2003.

LI, Y. Z.; HO, Y. P.; CHEN, S. T.; CHIOU, T. W.; LI, Z. S.; SHIUAN, D. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 2, p. 215-220, 2009.

LIEBLER, C. D. **Introduction to Proteomics: Tools for the new biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002, 198 p.

LÓPEZ, L. J. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 849, p. 190-202, 2007.

LUCIANO, R.L.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; STOPPA, G.F.Z.; KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M. Avaliação das Provas de Inibição de Hemaglutinação (Hi) de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) para a Detecção de Anticorpos Contra *Mycoplasma Synoviae* em Reprodutoras Comerciais. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.113-198, jul./dez., 2007

MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; EDWARDS, R.; MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. **Infect. Immun.** v. 74, n.1, p. 160-166, 2006.

MAENPUEN, S.; SOPITTHUMMAKHUN, K.; YUTHAVONG, Y.; CHAIYEN, P.; LEARTSAKULPANICH, U. Characterization of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase—A potential antimalarial target. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, p. 63–73, 2009.

MATIC, J. N.; WILTON, J. L.; TOWERS, R. J.; SCARMAN, A. L.; MINION, F. C.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. The pyruvate dehydrogenase complex of *Mycoplasma hyopneumoniae* contains a novel lipoyl domain arrangement. **Gene**, v. 319, p. 99-106, 2003.

MATTE, A.; SIVARAMAN, J.; EKIEL, I.; GEHRING, K.; JIA, Z.; CYGLER, M. Contribution of structural genomics to understanding the biology of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.185, p.3994-4002, 2003.

MESSIER, S.; ROSS, R.F. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranas with porcine lymphocytes. **American Journal of Veterinary Research.**, v.52, p.1497-1502, 1991.

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

MUSATOVOVA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S.; BASEMAN, J. B. Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, *Mycoplasma genitalium*. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 8, p. 2845-2855, 2006.

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, n. 12, p. 6004-6009, 1998.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M. G. F.; BARRETO, M. L. Avian Mycoplasmosis Update. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v. 7, n. 1, p. 01-09, Jan-Mar. 2005.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, p. 217-224, 2000.

NASEEM, S.; MEENS, J.; JORES, J.; HELLER, M.; S DÜBEL, S.; HUST, M.; GERLACH, G. F. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. **Vet. Microbiol.**, 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.071

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

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.

NYBORG, J. Possible evolution of factors involved in protein biosynthesis. **Acta Biochimica Polonica**, v, 45, n. 4, p. 883-894, 1998.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

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

PLATH, P.; RAPOPORT, T. A. Spontaneous Release of Cytosolic Proteins from Posttranslational Substrates before their Transport into the

Endoplasmic Reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 1, p. 167–178, 2000.

PLEBANI, M. Proteomics: The next revolution in laboratory medicine? **Clínica Chimica Acta**, n. 357, p. 113-122, 2005.

RAMÍREZ, A. S.; FLEITAS, J. L.; ROSALES, R. S.; POVEDA, C.; FE, C. de La.; ANDRADA, M.; CASTRO, A.; POVEDA, J. B. A semi-defined médium without serum for small ruminant mycoplasmas. **The Veterinary Journal**, p. 1-4, 2008.

RAMÍREZ, A. S.; NAYLOR, C. J.; HAMMOND, P. P.; BRADBURY, J. M. Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. **Vet. Microbiol.**, v. 118, p. 76-82, 2006.

RAMOS, Y.; GARCÍA, Y.; LLOPIZ, A.; CASTELLANOS-SERRA, L. Selectivity of bacterial proteome fractionation based on differential solubility: A mass spectrometry evaluation. **Analytical Biochemistry**, n. 377, p. 134-140, 2008.

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

REGULA, T. J.;UEBELE, B.; BOGUTH, G.; GÖRG, A.; SCHNÖLZER, M.; HERRMANN, R.; FRANK, R. Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3765-3780, 2000.

REINDERS, J.; LEWANDROWSKI, U.; MOEBIUS, J.; WAGNER, Y.; SICKMANN, A. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3686- 3703, 2004.

ROBERTS, R. J. Identifying protein function--a call for community action. **PLoS Biol.** v. 2, n. 3, p. 0293-0294, 2004.

ROCA, B. Infecciones por micoplasmas. **Rev. Clin. Esp.**, v. 206, n. 5, p. 239-242, 2006.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A. da.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R. de.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M. da.; GROSSI-DE-DÁ, M. de F. Comunicado Técnico 136 :Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 1-12, 2005.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 436-440, 1998.

SACHON, E.; MATHERON, L.; CLODIC, G.; THIERRY BLASCO, T.; BOLBACH, G. MALDI TOF-TOF characterization of a light stabilizer polymer contaminant from polypropylene or polyethylene plastic test tubes. **Journal of Mass Spectrometry**, 2009. DOI 10.1002/jms.1687

SANTOS, J. R. G.; GIL-TURNES, C. Probióticos em Avicultura. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SANTOS, M. P.; TEIXEIRA, M. C. SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, p. 7-17, 2004.

SAVAGLIA, F. Liderança Mundial. **Revista Nacional da Carne**, p. 38-48, março 2009.

SILVA, R.C.F.; NASCIMENTO, E.R. do.; PEREIRA, V.L.A.; BARRETO, M.L.; NASCIMENTO, M.G.F do. *Mycoplasma synoviae* Infection on Newcastle Disease Vaccination of Chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39, p. 384-389, 2008.

SRINIVASAN, R.; RAJESWARI, H.; BHATT, B. N.; INDI, S.; AJITKUMAR, P. GTP/GDP binding stabilizes bacterial cell division protein FtsZ against degradation by FtsH protease in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 357, n. 1, p. 38-43, 2007.

STEPANOVA, E.; LEE, J.; OZEROVA, M.; SEMENOVA, E.; DATSENKO, K.; WANNER, B. L.; SEVERINOV, K.; BORUKHOV, S. Analysis of Promoter Targets for *Escherichia coli* Transcription

Elongation Factor GreA In Vivo and In Vitro. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 8772-8785, 2007.

STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. **Rev. Sci. Tech.**, v. 15, n. 4, p. 1495-1525, 1996.

STIRLING, P. C.; SRAYKO, M.; TAKHAR, K. S.; POZNIAKOVSKY, A.; HYMAN, A. A.; LEROUX, M. R. Functional Interaction between Phosducin-like Protein 2 and Cytosolic Chaperonin Is Essential for Cytoskeletal Protein Function and Cell Cycle Progression. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 2336–2345, 2007.

SU, H. C.; HUTCHISON III, C. A.; GIDDINGS, M. C. Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumonia*. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 63, 2007. doi:10.1186/1471-2180-7-63

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Anal Bioanal Chem**, n. 376, p. 952-965, 2003.

TAYLOR, J. C.; BOCK, C. W.; FUSAO TAKUSAGAWA, F.; MARKHAM, G. D. Discovery of Novel Types of Inhibitors of S-Adenosylmethionine Synthesis by Virtual Screening. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 5967–5973, 2009.

TERENZI, H.; ALZARI, P.M.; ZAKIN, M.M. Structural features involved in the formation of a complex between the monomeric or the dimeric form of Rev-erb β DNA-binding domain and its DNA reactive sites. **Biochemical**, n.37, p. 11488-11495, 1998.

THOMAS, J.; RIGDEN, D. J.; CRONAN, J. E. Acyl Carrier Protein Phosphodiesterase (AcpH) of *Escherichia coli* Is a Non-Canonical Member of the HD Phosphatase/Phosphodiesterase Family. **Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 129-136, 2007.

TINÔCO, I. F. F. Avicultura Industrial : Novos Conceitos de Materiais, Concepções e Técnicas Construtivas Disponíveis para Galpões Avícolas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, 2001. doi: 10.1590/S1516-635X2001000100001

URSIC, D.; SEDBROOK, J. C.; HIMMEL, K. L.; CULBERTSON, M. R. The Essential Yeast Tcpl Protein Affects Actin and Microtubules. **Molecular Biology of the Cell**, v. 5, p. 1065-1080, 1994.

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** n. 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.

WASHBURN, M. P.; YATES, J. R.; Analysis of the microbial proteome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 292-297, 2000.

WASINGER, V. C.; POLLACK, J. D.; HUMPHERY-SMITH, I. The proteome of *Mycoplasma genitalium* Chaps-soluble component. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n, 6, p. 1571-1582, 2000.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice: a laboratory manual of proteome analysis**. 3. ed. Wiley-VHC Verlag-GmbH: Weinheim, 2002, 293 p.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K. GOLAZ, O. SANCHEZ, J. C. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology** (NY), 14, p. 61-65, 1996.

WISNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 359-362, 2009.

WOOD, Z. A.; SCHRÖDER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L. B.; Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 32-40, 2003.

XU, Q. S.; JANCARIK, J.; LOU, Y.; KUZNETSOVA, K.; YAKUNIN, A. F.; YOKOTA, H.; ADAMS, P.; KIM, R.; KIM, S. H. Crystal

structures of a phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis* and its complex with acetyl phosphate. **J. Struct. Funct. Genomics**, v. 6, n. 4, p. 269-279, 2005.

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

YANAGIDA, M. Functional proteomics: Current achievements. **Journal of Chromatography B**, n. 771, p. 89-106, 2002.

YAVLOVICH, A.; RECHNITZER, H.; ROTTEM, S. α -Enolase Resides on the Cell Surface of *Mycoplasma fermentans* and Binds Plasminogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5716-5719, 2007.