

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Construção e caracterização de uma quimera de antígenos recombinantes de
*Mycoplasma hyopneumoniae***

Natasha Rodrigues de Oliveira

Pelotas, 2014

NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**Construção e caracterização de uma quimera de antígenos recombinantes de
*Mycoplasma hyopneumoniae***

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin
Orientador de Estágio: Dr. Sérgio Jorge

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48c Oliveira, Natasha Rodrigues de

Construção e caracterização de uma quimera de antígenos recombinantes de mycoplasma hyopneumoniae / Natasha Rodrigues de Oliveira ; Odir Antônio Dellagostin, orientador. — Pelotas, 2014.

51 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Mycoplasma hyopneumoniae. 2. Proteína quimérica. 3. Vacina de subunidade. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Título.

CDD : 660.6

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daiane Hartwig, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Sérgio Jorge, Universidade Federal de Pelotas

Dra. Vanessa Galli, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (orientador)

“Dedico este trabalho de conclusão de curso a minha mãe, Isoni, por todo sacrifício, apoio e amor incondicional; e ao meu pai, Zeco, por ter sido um exemplo maravilhoso de coragem e dedicação durante os anos que Deus permitiu que convivêssemos juntos.”

Agradecimentos

A Deus, por todas as conquistas alcançadas e por ter me dado forças para chegar até aqui, mesmo diante dos momentos mais difíceis;

À minha mãe, por todo sacrifício e empenho para que eu concluísse este curso e especialmente ao meu pai, que apesar de não estar mais presente entre nós transmitiu a mim um legado de esforço, dedicação e persistência;

À Universidade Federal de Pelotas e professores do Núcleo de Biotecnologia, por ofertar um curso de graduação de qualidade;

Ao meu orientador Odir Antônio Dellagostin pela oportunidade de estágio, orientação, incentivo e confiança depositada;

Aos coorientadores, e acima de tudo amigos, Sérgio e Charles, por todos os ensinamentos transmitidos, dedicação, apoio incondicional, parceria, paciência e principalmente pela grande amizade e infinitos momentos de alegria proporcionados;

À querida Silvana, pela orientação e carinho, mesmo estando distante;

Aos demais colegas do laboratório de Vacinologia, Carol, Michele, Luciana, Thaís, Carlos, Ana, Schuch, e Tom, pela convivência amigável, ajuda e incentivo;

À amiga e irmã Gilliana Bastos e a sua querida família. Não tenho palavras para descrever a importância que tens para mim e o que significou ser madrinha deste anjo que colocastes em minha vida chamada Valentina. Obrigada por me fazer sorrir novamente depois dos difíceis momentos que vivi;

À amiga Daniele Masiero, cujo apoio, incentivo, compreensão e dedicação foram essenciais ao longo deste curso, e principalmente para a realização deste trabalho de conclusão. Obrigada por estar presente durante minhas tristezas e conquistas; e aos demais amigos e colegas que conquistaram meu carinho: Juliana Azambuja, Catrine Mortola, Franciele Masiero, Grégori Reinhardt e Rodrigo Schuch.

Ao CNPq e a UFPel, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Muito obrigada!

Resumo

DE OLIVEIRA, Natasha Rodrigues. **Construção e caracterização de uma quimera de antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória infecciosa responsável por importantes perdas econômicas a cadeia de produção suinícola. A vacinação é considerada a forma mais efetiva de controlar a doença. Vacinas comerciais são mundialmente utilizadas e consistem em preparações com bactérias inteiras inativadas (bacterinas) que, apesar de reduzir os sinais clínicos e diminuir as lesões pulmonares, oferecem somente proteção parcial contra a doença. Esforços para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes têm focado na produção de proteínas recombinantes e alguns antígenos já foram caracterizados. Dentre estes estão a região C-terminal da adesina P97 (P97R1), que desempenha papel na aderência do patógeno ao trato respiratório do hospedeiro, a proteína de superfície P46, a proteína associada à membrana P95 e a proteína de choque térmico P42. Estes antígenos foram previamente avaliados como vacinas de subunidade monovalentes demonstrando-se altamente antigênicos e imunogênicos, estando possivelmente associados à patogênese da doença. Neste trabalho um gene sintético contendo antígenos fusionados das proteínas P97R1, P46, P95 e P42 de *M. hyopneumoniae* foi construído, clonado e expresso em *Escherichia coli*. A proteína quimérica recombinante obtida foi caracterizada por *Western blot* (WB) e ELISA indireto, utilizando anticorpos monoclonais e soro hiperimune contra cada uma das subunidades bem como soros de suínos convalescentes provenientes de diferentes rebanhos, respectivamente. As subunidades P97R1, P46, P95 e P42 foram reconhecidas pelos anticorpos específicos conforme resultado do *Western blot*, indicando que a proteína quimérica manteve a exposição de epítomos similares às proteínas quando avaliadas individualmente. Além disso, a proteína quimérica foi reconhecida pelo soro de suínos convalescentes, comprovando sua antigenicidade na espécie alvo. Esta construção mostrou-se antigênica sendo um potencial candidato para o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente para o controle da PES e será posteriormente avaliada em modelo animal.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*; proteína quimérica; vacina de subunidade.

Abstract

DE OLIVEIRA, Natasha Rodrigues. **Construction and characterization of a chimeric protein from recombinant antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of enzootic pneumonia (EP), an infectious respiratory disease responsible for significant economic losses in pig industry. Vaccination is considered the most efficient control measure of the disease. Commercial vaccines are used worldwide and consist of inactivated whole-cell preparations (bacterins) that, although reducing the clinical signs, offer only partial protection against the disease. Efforts to develop more effective vaccines have focused on the production of recombinant proteins. Among the antigens that have already been characterized are the C-terminal region of the adhesin P97 (P97R1), which plays a role in the pathogen adherence on the host respiratory tract, the surface protein P46, the outer membrane protein P95 and the heat shock protein P42. These antigens had been previously evaluated as monovalent subunit vaccines showing antigenic and immunogenic properties and thus possibly associated with the pathogenesis of the disease. In this work, a synthetic gene containing fused antigens of *M. hyopneumoniae* (P97R1, P46, P95 and P42) was constructed, cloned and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant chimeric protein obtained was characterized by Western blot (WB) and by an indirect ELISA using monoclonal antibodies and hyperimmune serum against each of the subunits as well as sera from convalescent pigs from different herds, respectively. The P97R1, P46, P95 and P42 subunits were recognized by specific antibodies as a result of the Western blot, indicating that the chimeric protein retained similar epitopes exposure of proteins when evaluated individually. In addition, the chimeric protein was recognized by sera from convalescent pigs, confirming its antigenicity in the target specie. This construction showed to be a potential candidate antigen for the development of a more effective vaccine for the control of EP and will be further evaluated in an animal model.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*; chimeric protein; subunit vaccine.

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática da construção gênica e da proteína quimérica	34
Figura 2	Análise da digestão enzimática dos vetores pBSK/ <i>p97r1p46p95p42</i> e pAE	34
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose 0,8% para triagem dos vetores recombinantes	35
Figura 4	Caracterização enzimática dos clones recombinantes	35
Figura 5	Teste de expressão e solubilidade dos clones recombinantes	36
Figura 6	Caracterização da rP97R1P46P95P42 através de <i>Western blot</i>	37
Figura 7	Caracterização da rP97R1P46P95P42 através de ELISA	37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Locus gênico, anotação, número de referência no NCBI, função, fragmento selecionado e massa molecular dos fragmentos que compõem a proteína quimérica.....	33
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

PES	Pneumonia enzoótica suína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Kb	Quilobases
µm	Micrômetro
SPF	<i>Specific-pathogen-free</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
BALT	Tecidos linfoides associados aos brônquios
PRDC	<i>Porcine Respiratory Disease Complex</i> (Complexo de Doenças Respiratórias de Suínos)
PRRSV	<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vírus</i> (Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva de suínos)
PCVAD	<i>Porcine Circovirus Associated Disease</i> (Doenças Associadas ao Circovírus Suíno tipo 2)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
WB	<i>Western blot</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
IL-1β	Interleucina-1 Beta
IFN-γ	Interferon-gama
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-18	Interleucina-18
IL-10	Interleucina-10
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i> (Sequências Codificadoras de DNA)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
aa	Aminoácidos
kDa	Quilodaltons
pb	Pares de bases
LB	Luria-Bertani
µF	Microfarads

Ω	Ohm
kV	Kilovolts
μg	Microgramas
μl	Microlitros
ml	Mililitros
rpm	Rotações por minuto
DO	Densidade Óptica
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
kHz	Quilohertz
PEG	Polietilenoglicol
mAb	Anticorpo monoclonal
OPD	O-phenylenediamine dihydrochloride
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
DAB	3,3'-diaminodbenzidine

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Revisão de literatura	16
3.1 Características gerais.....	16
3.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	17
3.3 Patogênese.....	18
3.4 Epidemiologia e transmissão.....	20
3.5 Diagnóstico.....	20
3.6 Controle e prevenção.....	22
3.7 Imunidade.....	24
3.8 Vacinas recombinantes.....	25
4. Metodologia	28
4.1 Construção <i>in sílico</i> do gene sintético.....	28
4.2 Clonagem do gene sintético em <i>E. coli</i>	29
4.3 Transformação em <i>E. coli</i>	29
4.4 Triagem dos clones recombinantes.....	29
4.5 Teste de expressão e solubilidade das proteínas recombinantes.....	30
4.6 Purificação da proteína quimérica recombinante.....	30
4.7 Caracterização da proteína quimérica por <i>Western blot</i>	31
4.8 Caracterização da proteína quimérica por ELISA.....	32
4.9 Análise estatística.....	32
5. Resultados	33
5.1 Construção e clonagem do gene sintético.....	33
5.2 Caracterização dos clones recombinantes.....	34
5.3 Produção da proteína quimérica.....	36
5.4 Caracterização e avaliação da antigenicidade da proteína quimérica.....	36
6. Discussão	39
7. Conclusão	42
8. Referências	43

1. Introdução

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma das doenças respiratórias responsáveis pelas maiores perdas econômicas à cadeia de produção suinícola. Esta doença é causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*; este gênero *Mycoplasma* é caracterizado pelo tamanho diminuto (0,3-0,8 μm) e ausência de parede celular. A PES se manifesta de forma crônica e infecciosa com distribuição mundial, caracterizada por tosse crônica, retardo no crescimento, baixa mortalidade e alta morbidade (Maes et al., 1996). Os prejuízos econômicos causados pela PES estão associados principalmente aos custos com tratamento, desempenho reduzido de suínos em fase de crescimento e terminação e a consequente redução do preço da carcaça (Sibila et al., 2007). A PES é transmitida horizontalmente através do contato direto entre os animais infectados e/ou pela eliminação de secreções carregadas pelo ar, ou verticalmente das porcas para os leitões (Thacker, 2006). A prevalência da doença é particularmente elevada em animais em idade de finalização para o abate e a severidade dos sinais clínicos é ditada pela cepa de *M. hyopneumoniae* envolvida, pressão infecciosa, presença de infecções secundárias e pelas condições sanitárias da granja (Sibila et al., 2009).

A vacinação associada com melhorias nas técnicas de manejo e uso de antimicrobianos parece ser a forma mais efetiva de controle da enfermidade (Ross et al., 1986). As vacinas disponíveis comercialmente consistem em preparações de células inteiras inativadas (bacterinas), que promovem melhorias nas taxas de produção, diminuição do tempo para atingir o peso de abate, redução dos sinais clínicos e lesões pulmonares e melhoria na qualidade da carcaça (Haesebrouck et al., 2004). Apesar dos efeitos benéficos conferidos pelas bacterinas, as mesmas oferecem somente proteção parcial; a imunização com estas vacinas induz a produção de anticorpos em suínos, porém, não impede a colonização do patógeno no trato respiratório e, portanto, o estabelecimento da infecção e o desenvolvimento da doença (Thacker et al., 1998). Além disto, estas vacinas possuem custo elevado de produção e os efeitos benéficos são variáveis entre os rebanhos.

Estudos visando o desenvolvimento de uma vacina mais efetiva que ofereça proteção contra as diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* circulantes e que previna a infecção tem sido amparados por ferramentas de vacinologia reversa e focam, principalmente, em fatores de virulência e proteínas de superfície do patógeno. A

tecnologia do DNA recombinante, portanto apresenta-se como uma ferramenta que pode ser utilizada para solucionar os problemas encontrados com as vacinas convencionais (Simionatto et al., 2013). Vacinas de subunidade recombinantes apresentam diversas vantagens em comparação às bacterinas: são consideravelmente mais seguras, com menor ocorrência de reações adversas e também com possibilidade de produção em larga escala das proteínas recombinantes pelo processo biotecnológico (Soria-Guerra et al., 2011).

Dos antígenos de *M. hyopneumoniae* avaliados até o momento como vacinas de subunidade recombinantes, poucos apresentaram potencial para serem utilizados como candidatos vacinais. Entre estes antígenos destacam-se a região C-terminal da adesina P97 (P97R1), que desempenha papel na aderência do patógeno ao trato respiratório do hospedeiro (Shimoji et al., 2003; Chen et al., 2006; Conceição et al., 2006; Okamba et al., 2010); a proteína de superfície de membrana P46 (Chen et al., 2008; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012) a proteína de membrana externa P95 (Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012) e a proteína de choque térmico P42 (Chen et al., 2003; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Marchioro et al., 2014b). Embora alguns destes antígenos já tenham sido avaliados em diferentes formulações vacinais em modelo experimental (Chen et al., 2006; Conceição et al., 2006; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012) ou suíno (Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2010; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Marchioro et al., 2014b), os mesmos forneceram somente proteção parcial contra a doença. Como alternativa, a construção de proteínas quiméricas com multi-antígenos fusionados é uma opção interessante, pois permite a entrega simultânea destes alvos vacinais e em uma única dose de imunização (Liljeqvist & Stahl, 1999).

O objetivo principal deste trabalho foi a construção, produção e caracterização de uma quimera sintética composta pela fusão dos antígenos P97R1, P46, P95 e P42 de *M. hyopneumoniae* como uma potencial candidata a compor uma vacina de subunidade recombinante para o controle da PES.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

- Produzir e caracterizar uma proteína quimérica recombinante composta pela fusão dos antígenos P97R1, P46, P95 e P42 de *M. hyopneumoniae* visando desenvolver uma vacina mais eficiente contra a Pneumonia Enzoótica Suína.

2.2 Objetivos específicos

- Construir um gene sintético contendo porções antigênicas fusionadas das quatro proteínas de *M. hyopneumoniae* (P97R1; P46, P95 e P42).

- Clonar o fragmento gênico correspondente a proteína quimérica rP97R1P46P95P42 em vetor de expressão (pAE) em *Escherichia coli*;

- Expressar a proteína quimérica recombinante em *E. coli* e avaliar sua antigenicidade com as técnicas de *Western blot* e ELISA, utilizando anticorpos contra cada uma das subunidades da proteína quimérica e soro de suínos convalescentes.

3. Revisão de literatura

3.1 Características gerais

Os micoplasmas pertencem à classe *Mollicutes*, composta pelos gêneros *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasmae* e *Ureaplasma* ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* (Walker, 2003). A maioria das bactérias desta classe é patogênica e infecta uma grande variedade de hospedeiros, porém somente os membros do gênero *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são importantes em medicina veterinária (Conceição & Dellagostin, 2006). Os *Mollicutes* possivelmente evoluíram de um ancestral comum gram-positivo e destacam-se pela presença de um baixo conteúdo citosina-guanina (23-28%), elevado conteúdo adenina-timina (acima de 70%) e um genoma reduzido, entre 580 a 1350 kb (Citti & Blanchard, 2013; Simionatto et al., 2013).

Os micoplasmas são considerados os menores organismos autorreplicantes de vida livre conhecidos (Razin & Yogev, 1998) e devido à ausência de parede celular apresentam morfologia pleomórfica com diâmetro na forma esférica entre 0,3 a 0,8 μm . Estas bactérias são delimitadas por uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, sendo este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana (Conceição & Dellagostin, 2006). A ausência de uma parede celular também os torna mais sensíveis às condições ambientais como pressão osmótica e uso de detergentes, por outro lado, são resistentes a antibióticos que interferem com a síntese da mesma (Sobestiansky, 1999).

O pequeno genoma dos micoplasmas também resultou na redução da sua capacidade codificante e em um limitado número de rotas biossintéticas, tornando-os dependentes de suplemento exógeno e conseqüentemente organismos fastidiosos sobre condições de cultivo em laboratório, requerendo meios complexos (Sirand-Pugnet et al., 2007; Citti & Blanchard, 2013). Este gênero também apresenta especificidade por hospedeiros, dos quais retiram a maior parte de seus nutrientes. Tal característica ocasiona na falta de pequenos modelos animais que reproduzam a doença em condições de laboratório, dificultando os estudos relacionados aos mecanismos de patogênese da bactéria (Citti & Blanchard, 2013).

Micoplasmas também são contaminantes comuns de culturas celulares causando variados efeitos e alterações na rotina de cultivo ou de investigações experimentais. Mais de 20 espécies já foram isoladas de linhagens celulares contaminadas, sendo as mais recorrentes *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans* e *M. hominis* (Drexler & Uphoff, 2003). A ausência da parede celular favorece a passagem destes microrganismos por membranas de 0,22 µm, utilizadas na esterilização de meios de cultura, além disso, os torna resistentes a maioria dos antimicrobianos que afetam a sua síntese (Conceição & Dellagostin, 2006), dificultando a eliminação destes patógenos das culturas celulares.

3.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae é um patógeno espécie-específico causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória crônica que acomete suínos em produção em todo mundo. A PES é altamente contagiosa caracterizada por tosse crônica não produtiva, broncopneumonia catarral, retardo no crescimento e no ganho de peso, baixos índices de mortalidade e elevada morbidade (Maes et al., 2008; Sibila et al., 2009). Este patógeno também está envolvido no Complexo de Doenças Respiratórias de Suínos (PRDC), que junto com a PES são responsáveis pelos maiores impactos econômicos na indústria suinícola (Chae, 2005; Thacker, 2006). Os isolados deste microrganismo tem demonstrado grande variabilidade genética que possivelmente esta associada com a existência de complexos sistemas de recombinação capazes de criar uma taxa elevada de diversidade antigênica (Dybvig & Voelker, 1996).

M. hyopneumoniae é uma das poucas espécies de micoplasmas cultiváveis *in vitro*, mas apresenta crescimento fastidioso sendo necessário meio Friis suplementado com soro suíno SPF (*specific-pathogen-free*) (Friis, 1975). Como consequência, o cultivo e isolamento deste patógeno é laborioso, consome tempo e frequentemente não tem sucesso (Marois et al., 2007; Mattsson et al., 1995; Simionatto et al., 2013). As condições ideais de cultivo para esta bactéria são temperatura ótima de 37 °C, pH em torno de 7.5, atmosfera de 5 a 10% de CO₂ e leve agitação (Walker, 2003). Entretanto a presença de outras bactérias e outros micoplasmas, como *M. hyorhinis* e *M. flocculare* dificulta o isolamento do patógeno,

sendo necessários meios de cultura seletivos (Mattsson et al., 1995; Thacker, 2006). Outra característica importante é que *M. hyopneumoniae* não utiliza código genético universal. Nesta bactéria o códon TGA codifica para o aminoácido triptofano enquanto que, nos outros organismos, este códon é reconhecido como um códon de terminação, dificultando a expressão de proteínas de interesse em sistemas heterólogos como *E. coli* (Razin & Yogev, 1998).

3.3 Patogênese

M. hyopneumoniae é um patógeno extracelular e o processo de infecção tem início com a adesão da bactéria a receptores específicos presentes nos cílios do epitélio respiratório dos suínos induzindo ao desenvolvimento de pneumonia por uma variedade de mecanismos (Debey & Ross, 1994). O mecanismo de patogenicidade é complexo, e envolve adesão e colonização, citotoxicidade, competição por substratos, evasão e modulação da resposta imune do hospedeiro (Simionatto et al., 2013). Após atingir o trato respiratório dos suínos a bactéria atravessa a camada de muco e se adere ao epitélio ciliado da traqueia, brônquios e bronquíolos e com o progresso da infecção promove a redução da atividade ciliar com perda gradual dos cílios e acúmulo da bactéria nas células remanescentes (Maes et al., 1996). A completa perda dos cílios possivelmente está relacionada com a produção de substâncias tóxicas e nocivas do metabolismo de *M. hyopneumoniae* como peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos (Razin & Yogev, 1998).

Durante a fase aguda da doença, histologicamente observa-se perda dos cílios, esfoliação de células ciliadas, e acúmulo de neutrófilos e macrófagos em torno das vias aéreas (Choi et al., 2006). A fase crônica caracteriza-se por hiperplasia linfóide e espessamento dos septos intraveolares (Kwon et al., 2002). A infecção por *M. hyopneumoniae* também causa intensiva resposta imune inflamatória nos tecidos linfóides associados aos brônquios (BALT), o que contribui para o dano aos pulmões (Okada et al., 2000). Lesões macroscópicas sugestivas de PES são frequentemente observadas nos pulmões dos suínos durante o abate. Estas lesões não são patognomônicas e consistem em áreas de consolidação pulmonar de coloração púrpuro-acinzentada, localizadas principalmente nos lobos apicais, cardíacos e intermediários dos pulmões, desaparecendo de 12-14 semanas após a infecção

(Sobestiansky, 1999; Maes et al., 2008). Como consequência do comprometimento da mucosa respiratória, considerada uma barreira de defesa primária, e da formação de lesões pulmonares, os animais ficam predispostos a ocorrência de infecções secundárias e oportunistas por outros patógenos como *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fagan et al., 2001), contribuindo para a maior morbidade e mortalidade associadas à doença (Bai et al., 2013). Além disso, a coinfeção de suínos com *M. hyopneumoniae*, o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva (PRRSV) e/ou doenças associadas ao circovírus suíno tipo 2 (PCVAD) pode aumentar a severidade da doença contribuindo para a piora das taxas de decréscimo da produção e mortalidade dos animais.

O exato mecanismo de aderência da bactéria ao epitélio ciliar ainda não está bem esclarecido, no entanto, algumas proteínas envolvidas neste processo já foram identificadas. *M. hyopneumoniae* expressa em sua superfície muitas adesinas, cuja função principal é a aderência aos cílios do epitélio respiratório (Robinson et al., 2013). Algumas destas adesinas sofrem processamentos proteolíticos e os fragmentos gerados se ligam a moléculas do tecido hospedeiro como glicosaminoglicanos, heparina, fibronectina e o plasminogênio, facilitando sua fixação (Bogema et al., 2011). Zhang e colaboradores (1995) identificaram a proteína P97 como uma importante adesina responsável pela aderência de *M. hyopneumoniae* às células do epitélio respiratório dos suínos. Esta proteína é altamente imunogênica e bem conservada entre diversas cepas de *M. hyopneumoniae*. Sua porção C-terminal é composta por duas regiões repetidas em *tandem*, denominadas R1 e R2. A região R1 contém uma sequência repetida de até cinco aminoácidos (AAKPV/E) que é necessária para a ligação aos receptores ciliares no epitélio respiratório dos suínos durante o processo de infecção (Minion et al., 2000). A ligação aos receptores ciliares requer no mínimo 8 repetições, enquanto que para o reconhecimento por anticorpos apenas 3 unidades repetitivas são suficientes (King et al., 1997). A proteína P102 faz parte do mesmo operon da adesina P97 e embora sua função não pareça estar associada à ligação do patógeno aos cílios do epitélio respiratório, estudos sugerem que esta proteína pode ser um fator de virulência uma vez que é expressa “*in vivo*” durante a infecção (Adams et al., 2005). Outras adesinas multifuncionais pertencentes a famílias parálogas à P97/P102 incluem Mhp0182 (P102), Mhp0183 (P97), Mhp0493 (P159),

Mhp0494 (P216), Mhp0683 (P135), Mhp0271, Mhp0107 e Mhp0108 (P116). Apesar disto, estudos adicionais são necessários para elucidar o papel destes antígenos durante a infecção, bem como dos mecanismos envolvidos na patogenia do microrganismo (Simionatto et al., 2013).

3.4 Epidemiologia e transmissão

A PES é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade, afetando principalmente suínos em fase de crescimento e terminação; no entanto, nos rebanhos sem imunidade para a doença suínos de todas as idades, incluindo leitões e matrizes, podem ser acometidos (Sibila et al., 2009). As perdas econômicas decorrentes da infecção por *M. hyopneumoniae* podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da severidade das lesões pulmonares e da ocorrência de infecções secundárias (Sobestiansky, 1999). Estima-se que *M. hyopneumoniae* esteja difundido em mais de 90% da criação mundial de suínos, com presença de lesões pulmonares sugestivas da PES em cerca de 40-50% dos animais abatidos (Burch, 2004). Estudos de prevalência a campo indicaram que entre 1,5% e 4% dos leitões entre 1 e 3 semanas de idade testados com *swabs* nasais ou necropsia já demonstram resultados de PCR positivo para presença do patógeno (Okada et al., 1999).

A introdução de *M. hyopneumoniae* nos rebanhos suínos ocorre via transmissão direta. Este patógeno pode ser transmitido pelo contato direto com secreções do trato respiratório de suínos infectados e/ou por meio de gotículas de aerosol geradas pela tosse dos animais infectados. A infecção disseminada pode ocorrer tanto de forma horizontal, de um animal infectado para outro sadio, como de forma vertical, das matrizes para os leitões (Sibila et al., 2008). Além disso, a transmissão por via aérea ao longo de vários quilômetros de distância entre diferentes rebanhos também já foi relatada (Otake et al., 2010). O período de incubação sobre condições experimentais varia de 10 a 16 dias e a soroconversão é lenta (Haesebrouck et al., 2004).

3.5 Diagnóstico

Embora o isolamento de *M. hyopneumoniae* seja considerado o “padrão ouro” para a detecção do microrganismo, o seu crescimento fastidioso dificulta a aplicação desta técnica na rotina diagnóstica. Como alternativa a técnica de PCR, o uso de sorologia e de outros ensaios imunológicos para detectar a presença do patógeno em amostras de tecido são alternativas viáveis e mais difundidas nos laboratórios de diagnóstico (Thacker, 2004).

Sinais clínicos e lesões patológicas podem ser utilizados apenas como diagnóstico presuntivo da doença, sendo necessária a realização de testes laboratoriais para o diagnóstico conclusivo (Simionatto et al., 2013). Em rebanhos acometidos pela PES é comum a ocorrência de infecções subclínicas em que há pouca ou nenhuma manifestação de sinais clínicos da doença e em muitos casos a infecção não é diagnosticada (Ruiz et al., 2002; Pijoan, 2005). Em alguns estudos, culturas positivas para *M. hyopneumoniae* não apresentaram correlação com a presença de lesões macro ou microscópicas (Armstrong et al., 1984). Outro fator limitante é que as lesões pulmonares não são patognomônicas da doença e lesões muito semelhantes podem ser causadas por outros patógenos, como *P. multocida* (Ross, 2007).

M. hyopneumoniae também pode ser detectado por ensaios de imunofluorescência e imunohistoquímica. Estes são considerados métodos de diagnóstico específicos, mas sofrem com a baixa sensibilidade, principalmente em infecções crônicas devido ao pequeno número de micoplasmas presentes nos tecidos (Maes et al., 1996). Estes ensaios são mais eficientes quando quantidades elevadas de antígenos estão presentes nas fases iniciais da infecção. Em estágios avançados, o número de micoplasmas diminui e o teste é frequentemente negativo, além disso, estas análises só podem ser realizadas em amostras *post-mortem* (Calsamiglia et al., 1999).

O monitoramento da PES em rebanhos suínos e abatedouros utiliza métodos de PCR e ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Um ELISA de bloqueio (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA kit, Oxoid) e dois ELISA indiretos (HerdCheck, IDEXX e Tween 20-ELISA), são os mais frequentemente utilizados em testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgG (Thacker, 2004). Entretanto a vacinação também pode induzir a produção de anticorpos IgG anti-*M. hyopneumoniae* que podem interferir na diferenciação entre animais naturalmente

infectados e vacinados. Embora estes testes sorológicos baseados em ELISA apresentem alta especificidade, sua sensibilidade é baixa, além disso, como a soroconversão é lenta, não é possível a detecção em estágios iniciais da infecção (Sibila et al., 2009).

O diagnóstico utilizando PCR tem sido descrito como o método mais sensível e específico, este método não depende do cultivo de bactérias viáveis e pode ser feito em animais vivos ou mortos (Calsamiglia et al., 1999). Diversas variações da técnica já foram descritas visando à detecção da bactéria em amostras de pulmão, *swab* nasal ou traqueal (Verdin et al., 2000; Caron et al., 2000; Kurth et al., 2002; Dubosson et al., 2004; Stakenborg et al., 2006; Strait et al., 2008; Cai et al., 2007; Yamaguti et al., 2008). Nested PCR é uma variação da técnica que utiliza dois conjuntos de *primers* para amplificar o gene que codifica para o 16S RNAr de *M. hyopneumoniae* sendo considerada bastante sensível, capaz de detectar a presença do agente em quantidades muito pequenas, embora possa resultar em falsos positivos (Calsamiglia et al., 1999). O uso de PCR para o diagnóstico da infecção natural a partir de *swab* nasal foi descrito como o mais promissor, uma vez que houve correlação entre a detecção de DNA da bactéria e a presença de lesões sugestivas da PES (Sibila et al., 2007).

Embora diferentes metodologias e variações objetivando um diagnóstico conclusivo para PES já tenham sido descritas, estas apresentam limitações quanto à sensibilidade e/ ou especificidade (Sibila et al., 2008). Em virtude disto, testes diagnósticos mais eficientes se fazem necessários.

3.6 Controle e prevenção

O controle da doença envolve a otimização das práticas de manejo, melhorias nas condições de alojamento dos animais, o uso de antimicrobianos e vacinação. Algumas medidas como a adoção do sistema de produção “*all-in, all-out*” (AIAO), podem reduzir os riscos de transmissão da doença devido à interrupção do ciclo de transmissão do patógeno entre suínos adultos e jovens. Outras medidas como um sistema de produção fechado que evita a compra de animais de outras fontes, redução da densidade de animais, tamanho do rebanho e aclimatação do ambiente podem reduzir os fatores de risco associados à PES (Maes et al., 2008).

Antimicrobianos como tetraciclina e macrolídeos são frequentemente utilizados no tratamento de doenças respiratórias como a PES (Vicca et al., 2004; Sibila et al., 2008). Entretanto, a eficácia dos programas de medicação é variável, eleva os custos de produção, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (Maes et al., 2008).

A vacinação associada às medidas de redução dos riscos a infecção parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES (Kavanagh, 1994; Lin et al., 2003). As vacinas comercialmente disponíveis consistem em preparações com células inteiras inativadas (bacterinas) associadas a adjuvantes, sendo mundialmente utilizadas (Haesebrouck et al., 2004). Existem diversas vacinas disponíveis no mercado que podem ser administradas em uma ou duas doses conforme recomendações do fabricante e esquema de vacinação adotado por cada granja. Para leitões, o esquema de vacinação mais usado consiste de duas doses (1ª aos 7 ou 14 dias de idade e a 2ª dose aos 21 ou 35-42 dias de idade) (Barcellos et al., 2007). Embora não previna a transmissão da doença, a vacinação das matrizes contra *M. hyopneumoniae* é recomendada, pois potencialmente reduz o risco de transmissão vertical do patógeno para os leitões e o curso da PES em suínos em crescimento (Sibila et al., 2008). Logo, o desenvolvimento de uma estratégia de vacinação apropriada pode envolver a vacinação de leitões, porcas, ou ambos (Sibila et al., 2009).

As principais vantagens conferidas pela vacinação incluem a redução dos sinais clínicos e grau de lesão pulmonar, aumento da performance dos animais através da melhoria no ganho de peso diário (2–8%), diminuição do tempo para atingir o peso de abate e redução dos custos com tratamento (Maes et al., 1999; Maes et al., 2008). Apesar de a vacinação conferir efeitos benéficos aos suínos infectados, os mesmos são variáveis entre os rebanhos (Simionatto et al., 2013). Além disto, estas vacinas são incapazes de prevenir a infecção e colonização do patógeno ao hospedeiro e, portanto, oferecem somente proteção parcial contra a doença (Thacker et al., 1998). O mecanismo pelo qual as bacterinas conferem efeitos positivos, como redução dos sinais clínicos e melhoria dos parâmetros de produção, em resposta à infecção causada pelo agente permanece pouco claro. Alguns estudos sugerem que os anticorpos de mucosa (IgAs) e resposta imune sistêmica mediada por células são importantes para o controle da doença (Thacker

et al., 2000). No entanto ainda não foi demonstrada a existência de correlação entre o título de anticorpos e proteção contra PES (Marchioro et al., 2013). Possivelmente as bacterinas atuam através da modulação do sistema imune do hospedeiro reduzindo os efeitos deletérios gerados por uma resposta inflamatória exacerbada.

3.7 Imunidade

A interação de *M. hyopneumoniae* com a resposta imune do hospedeiro pode ser um importante fator na patogênese da doença e possivelmente se dá através de um processo de modulação, embora este mecanismo ainda não esteja bem estabelecido (Haesebrouck et al., 2004; Bai et al., 2013). Os macrófagos são células de defesa importantes para a produção de várias citocinas pró-inflamatórias. Logo após a infecção, *M. hyopneumoniae* interage com células do sistema imune inato como fagócitos, macrófagos e células polimorfonucleares e induz os macrófagos a produzirem interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6, IL-8 e IL-18 tanto *in vivo* (Muneta et al., 2008) quanto *in vitro* (Damte et al., 2011; Hwang et al., 2008). Estas citocinas são responsáveis pela indução de infiltração peribronquiolar e perivascular por linfócitos mononucleares (Sarradell et al., 2003) e apesar de serem essenciais para a resolução da infecção, também possuem envolvimento no dano tecidual ao hospedeiro e desenvolvimento das lesões pulmonares (Conceição & Dellagostin, 2006). A indução de elevados níveis de TNF- α é conhecida por causar caquexia ou Síndrome de Wasting (caracterizada pela perda de massa muscular e adiposa) e possivelmente está associada ao retardo no crescimento dos suínos observado durante o progresso da PES (Choi et al., 2006). Os micoplasmas também são capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T. Embora a infecção por *M. hyopneumoniae* seja capaz de induzir elevada resposta inflamatória, a localização e fixação deste patógeno no lúmen to epitélio respiratório dos suínos permite seu escape das defesas naturais do hospedeiro, o que pode explicar a dificuldade de eliminação do agente (Marchioro et al., 2013). Outra estratégia de modulação do sistema imune do hospedeiro é a utilização da maquinaria genética para alterar antígenos de superfície através da variação de fase, variação do tamanho e do mascaramento de epítomos de proteínas de superfície, permitindo o estabelecimento de uma infecção crônica (Razin & Yogev, 1998).

A produção de citocinas anti-inflamatórias tem papel chave na redução da severidade das lesões pulmonares causadas pela resposta à infecção de *M. hyopneumoniae*. Alguns estudos demonstraram que a indução da secreção de IL-10 em suínos vacinados promove o influxo de macrófagos no tecido linfoide broncoalveolar após infecção com *M. hyopneumoniae* (Vranckx et al., 2011).

3.8 Vacinas recombinantes

A produção de vacinas convencionais requer o cultivo de microrganismos patogênicos e métodos para identificação de componentes importantes para imunidade. Este método nem sempre tem sucesso, principalmente tratando-se de microrganismos patogênicos e ou fastidiosos como *M. hyopneumoniae*. A vacinologia reversa engloba um conjunto de técnicas que permite a utilização da informação genômica para a identificação de potenciais alvos vacinais *in silico*, permitindo economia de tempo e dispensando o cultivo do patógeno (Rappuoli, 2001). O desenvolvimento de vacinas recombinantes contra PES utilizando a vacinologia reversa é uma opção viável e alguns antígenos de *M. hyopneumoniae* já foram identificados como potenciais candidatos para serem utilizados como vacinas de subunidade (Chen et al., 2003).

Até o momento quatro cepas patogênicas (cepa 232, 7448, 168 e 7422) e uma não patogênica (cepa J) de *M. hyopneumoniae* já tiveram seu genoma completamente sequenciado (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005; Liu et al., 2011; Siqueira et al., 2013; Liu et al., 2013). A disponibilização destas sequências permitiu uma análise comparativa entre os genomas visando a identificação de genes que codificam proteínas determinantes de patogenicidade e/ou com potencial para utilização em imunodiagnóstico e/ou vacinação (Castro, 2008). Os diferentes isolados de *M. hyopneumoniae* podem ser divididos em baixa, moderada ou alta virulência, entretanto poucos fatores de virulência são conhecidos até o momento (Vicca et al., 2003). Outro limitante é que esta bactéria não utiliza o código genético universal; em *M. hyopneumoniae* o códon TGA codifica para o aminoácido triptofano que é reconhecido como um códon de terminação por outras bactérias como *E. coli.*, por exemplo. Esta característica dificulta a produção de proteínas heterólogas em outros sistemas de expressão, sendo necessário evitar a seleção de sequências do

genoma que contém estes códons ou utilizar métodos de mutagênese sítio-dirigidos para substituição dos mesmos (Simionatto et al., 2009).

O sequenciamento de um isolado de campo patogênico (cepa 7448), realizado pelo Projeto Genoma Sul (Vasconcelos et al., 2005) permitiu a busca e análise de diversos potenciais alvos vacinais utilizando a técnica de vacinologia reversa. Nosso grupo de pesquisa produziu e avaliou a antigenicidade e a imunogenicidade em camundongos de 35 proteínas recombinantes e (Simionatto et al., 2010; Simionatto et al., 2009; Simionatto et al., 2012) e de 6 proteínas recombinantes transmembranas (Marchioro et al., 2012) com base no genoma desta cepa (GenBank acesso NC_007332). Algumas destas proteínas apresentaram potencial para serem utilizadas como antígenos vacinais, incluindo a proteína de superfície de membrana P46, a proteína de membrana externa P95, a adesina P97, e a chaperona molecular DnaK P42. Estes antígenos já foram testados em diferentes formulações, seja individualmente como vacinas de subunidade, vacinas de DNA ou como um coquetel vacinal (Shimoji et al., 2003; Chen et al., 2003; Chen et al., 2008; Okamba et al., 2010; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Marchioro 2014b). Esforços constantes têm sido realizados visando o desenvolvimento de vacinas efetivas e seguras contra a PES, entretanto, sua eficácia tem sido parcialmente bem sucedida e, até o momento, poucos antígenos tiveram seu potencial imunoprotetor testado em suínos (Fagan et al., 2001; Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2010; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Marchioro et al., 2014b), conferindo somente proteção parcial contra a doença, possivelmente devido a pobre imunogenicidade de vacinas monovalentes.

A adesina P97 de *M. hyopneumoniae*, identificada como um importante fator de adesão é um dos antígenos mais estudados e já foi avaliado em diferentes formulações vacinais. Okamba e colaboradores (2010) demonstraram que a imunização de suínos com um adenovírus recombinante expressando a porção C-terminal desta adesina (rAdP97c) via intranasal induziu alta resposta imune humoral e mediada por células específica contra P97c e ofereceu proteção parcial contra desafio experimental.

A proteína P42 é um fragmento de 42 kDa da chaperona molecular P65 (MHP0067), pertencente à família HSP70, uma proteína de choque térmico expressa em situações de estresse para a célula bacteriana. Este antígeno demonstrou

induzir forte resposta imune humoral e celular em camundongos quando avaliado como vacina de subunidade ou de DNA (Chen et al., 2003; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012). Além disso, os anticorpos anti-P42 foram capazes de se ligar a este antígeno específico, inibindo o crescimento “*in vitro*” de *M. hyopneumoniae* (Chen et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa avaliou a resposta imune humoral e celular estimulada pela proteína rP42 como vacina de subunidade emulsificada com um adjuvante à base de óleo em condições de campo em uma granja positiva para *M. hyopneumoniae* (Jorge et al., 2014). Neste ensaio P42 estimulou significativa expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 bem como a manutenção de elevados níveis de anticorpos no soro dos suínos imunizados.

Recentemente Marchioro (2014a) e colaboradores avaliaram a indução de resposta imune em suínos imunizados com uma quimera recombinante composta pelos antígenos P97R1, P42, NrdF fusionados a sequência adjuvante da subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), frente a uma infecção experimental de *M. hyopneumoniae*. A administração intranasal e intramuscular desta formulação induziu resposta imune de mucosa, com produção de IgA e resposta humoral com produção de IgG, sendo esta última significativamente maior no soro de suínos testado contra o antígeno P42, entretanto, a proteção fornecida contra a doença foi somente parcial.

As proteínas P46 e P95 são antígenos expostos na superfície de *M. hyopneumoniae*. Estas proteínas foram avaliadas como vacinas recombinantes monovalentes e apresentaram capacidade imunogênica em camundongos, induzindo ambas as respostas imune Th1 e Th2 através da indução de elevados níveis de expressão de INF γ , citocina associada a resposta imune celular, e redução da expressão de TNF α e IL1, relacionadas com as lesões em suínos, durante infecção por *M. hyopneumoniae* (Galli et al., 2012). Além disso, estes antígenos foram fortemente reconhecidos por soro de suínos convalescentes (Simionatto et al., 2012), indicando que os mesmos são expressos durante o processo infeccioso.

Assim como para muitas doenças infecciosas, a vacinação permanece sendo a abordagem mais efetiva para a prevenção e controle da PES e a erradicação do patógeno do animal infectado tem sido proposta por depender tanto da presença de anticorpos no soro como em um aumento da imunidade local e mediada por células durante a infecção (Thacker et al., 2000).

4. Metodologia

4.1 Construção *in silico* do gene quimérico

Para a produção da proteína quimérica, um gene sintético contendo fragmentos dos quatro antígenos selecionados foi construído com base nas sequências codificadoras (CDS) da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* depositadas no GenBank, número de acesso NC007332.

As sequências de aminoácidos de cada uma das quatro proteínas selecionadas, P97R1 (MHP0198), P46 (MHP0513), P95 (MHP0099) e P42 (MHP0067) foram obtidas em um arquivo FASTA e analisadas pelas seguintes ferramentas e softwares de bioinformática: SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que identifica a presença de peptídeo sinal; TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), que faz a topologia de proteínas de membrana; IEDB (<http://www.iedb.org/>) que busca epítomos de células B com base em um banco de dados de diversos organismos e Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam/>), que realiza a computação de parâmetros físicos e químicos de sequências proteicas. O programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen) foi utilizado na identificação de regiões hidrofílicas das proteínas e para o desenho do gene sintético.

Os fragmentos de cada proteína que atendiam aos seguintes requisitos foram selecionados: regiões expostas na superfície do patógeno, ausência de sequência sinal, regiões com maior sequência de epítomos para células B, regiões mais hidrofílicas (visando facilitar a expressão da proteína quimérica de forma solúvel) e regiões que conferiam maior estabilidade a estrutura final da proteína quimérica.

Sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l foram adicionados às extremidades do fragmento visando a clonagem direcional no vetor de expressão pAE (Ramos, 2004). *Linkers* contendo repetições de glicinas e serinas (Gly-Gly-Ser-Gly) foram inseridos entre cada porção gênica para permitir o correto dobramento da proteína quimérica. O gene foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (USA) com códons preferenciais para expressão em *E. coli* e entregue clonado no vetor pBluescript II SK(-) (pBSK).

4.2 Clonagem do gene sintético em *E. coli*

O gene sintético clonado no vetor pBSK e o vetor de expressão pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l (Invitrogen) durante 1 h e 30 min a 37 °C. O vetor pAE digerido foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIP) (New England Biolabs) a fim de evitar a recircularização do plasmídeo pela ligação das extremidades. A confirmação da eficiência das digestões foi visualizada em gel de agarose 0,8% e para a obtenção do gene, realizou-se a excisão da banda referente a um inserto de 1698 pb. O produto de cada digestão foi purificado com o kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Nova eletroforese foi realizada a fim de checar as purificações. Os DNAs foram quantificados e ligados com a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) durante 1 h a 16 °C.

4.3 Transformação em *E. coli* TOP 10

O produto da ligação foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* TOP 10, previamente preparadas conforme descrito por Sambrook & Russell (2001), pelo método de eletroporação (25 µF de capacitância, 200 ohms de resistência e 2.5 kV de voltagem). Após a transformação, as células foram plaqueadas em Luria-Bertani (LB) sólido (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 1,5% agar) suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e as placas incubadas a 37 °C por 16-18 h.

4.4 Triagem dos clones recombinantes

Colônias bacterianas isoladas foram selecionadas e submetidas a um protocolo de triagem por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio, pelo método Microprep (Jouglard et al., 2002). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os clones caracterizados como possíveis recombinantes foram cultivados em 5 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, incubados por 16-18 h a 37 °C. A partir deste cultivo, foi realizada uma extração de DNA plasmideal com o kit comercial GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare). O

DNA resultante desta extração foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*II sobre as mesmas condições descritas anteriormente, a fim de confirmar a presença do inserto.

4.5 Teste de expressão e solubilidade das proteínas recombinantes

Quatro plasmídeos recombinantes pAE/p97r1p46p95p42 foram transformados na cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3) por choque térmico. Cada clone recombinante transformado foi cultivado em 10 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina em agitador orbital (200 rpm) a 37 °C por 16-18 h. Um décimo desta cultura foi utilizado para inocular 10 ml de caldo LB com 100µ/ml de ampicilina e incubado a 37 °C até atingir a densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) de 0,6 a 0,8. Neste momento, 500 µl de cada cultura foi coletado e a indução proteica foi realizada com adição de 0,5 mM de Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen), os cultivos foram mantidos as mesmas condições de incubação por 3 h. Após a indução uma alíquota de 500 µl da cultura foi coletada. As amostras foram centrifugadas a 14000 × *g* por 2 min e os *pellets* foram suspensos em 80 µl de 0,1 M de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) contendo 20 µl de tampão de corrida 5X (62,5 mM Tris–HCl pH 6,8, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS). As amostras com extrato proteico total de cada clone foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% a fim de visualizar a expressão das proteínas recombinantes.

Para avaliar a solubilidade das proteínas recombinantes expressas foram coletados 2 ml de cada cultura induzida e as amostras foram centrifugadas a 14000 × *g* por 2 min. Os *pellets* foram suspensos em 500 µl de PBS-1X contendo 100 µg/ml de lisozima. As células foram lisadas por sonicação (6 × 10 segundos de pulsos) em banho de gelo e as frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 10,000 × *g* por 5 min. Ambas as frações foram submetidas a SDS-PAGE 10% para identificação da localização da proteína recombinante.

4.6 Purificação da proteína quimérica recombinante

A proteína recombinante foi expressa em 500 ml de meio LB acrescido de ampicilina sobre as mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 7000 rpm por 10 min a 4 ° C. O *pellet* foi suspenso em tampão contendo 200 mM de Na₂HPO₄; 0,5 M de NaCl; 5 mM de imidazole com pH 8,0. A proteína quimérica expressa de forma insolúvel, foi solubilizada em tampão contendo N-lauroyl sarcosine (0.2%) conforme descrito por Simionatto (2012). Ambas frações solúveis e insolúveis foram então lisadas por três sucessivos ciclos de sonicação (30 s, 20 kHz) e submetidas a um agitador orbital a 60 rpm por 18 h e 72 h à 4 °C, respectivamente. Após centrifugação à 10.000 × g por 60 min, 4 °C, o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,45 µm (Millipore) e a proteína foi purificada através de *Immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) em coluna de Ni²⁺-Sepharose carregada com 50 mM de sulfato de níquel (GE Healthcare). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% para visualização da pureza e, posteriormente, dialisadas contra PBS (pH 7,2) à 4 °C por 16-18 h, concentradas em polietilenoglicol (PEG) e estocadas à – 20 °C. A proteína recombinante foi quantificada pelo kit BCA Protein Assay (PIERCE), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.7 Caracterização da proteína quimérica por *Western blot*

O *Western blot* foi realizado conforme descrito por (Simionatto et al., 2012). A proteína quimérica purificada foi submetida a um SDS-PAGE 10% e eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare). Os anticorpos primários e diluições utilizadas foram os seguintes: anticorpo monoclonal (mAb) anti-6xHis (Sigma–Aldrich, USA), 1:5000; anticorpo monoclonal anti-R1 (F1B6) (obtido da Dra. Eileen Thacker – Iowa State University, Ames, IA, USA), 1:3000; soro hiperimune de camundongo anti-P46, anti-P95 e anti-P42, previamente produzidos por nosso grupo de pesquisa (Galli et al., 2012), 1:100 e *pool* (n=8) de soros de suínos convalescentes para PES, 1:50. Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, 1:6000 e anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), 1:6000, foram utilizados como anticorpos secundários. As reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

4.8 Caracterização da proteína quimérica por ELISA

ELISA foi realizado utilizando soros de suínos SPF (n=32) (obtidos de uma granja comercial em Campos Novos-SC) e de suínos convalescentes (n=105), (obtidos de granjas comerciais das cidades de Rio Grande e Piratini, RS e Campos Novos, SC). Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas a 4 °C por 16-18 h com 50 ng/poço da proteína quimérica purificada diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (PBS + 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com leite em pó 5 %, diluído em PBS-1X, por 1 h e 30 min a 37 °C. Após nova lavagem as placas foram incubadas com os soros dos suínos, na diluição 1:50 em solução bloqueio, e incubadas a 37 °C durante 1 h e 30 min. Depois de 3 lavagens, as placas foram incubadas com anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) diluído 1:6000, a 37 °C por 1 h e 30 min. A reação foi revelada com OPD (Sigma-Aldrich, USA) e H₂O₂ por 15 min e então parada com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico 3%. A densidade óptica foi determinada a 492 nm em leitor ThermoPlate ELX800 (BioTek Instruments).

4.9 Análise estatística

Significativas diferenças no resultado do ELISA foram identificadas por análise de variancia simples (One way ANOVA) seguida por pós-teste de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism 6. Um valor de $P < 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1 Construção e clonagem do gene sintético

Um gene de 1698 pb foi construído com auxílio de ferramentas de bioinformática. As sequências das proteínas P97R1 (MHP0198), P46 (MHP0513), P95 (MHP0099) e P42 (MHP0067) que apresentaram características desejáveis para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade foram selecionadas (Tabela 1). Os principais critérios utilizados foram a hidrofobicidade das proteínas, exposição na superfície da bactéria, ausência de peptídeo sinal e presença de epítomos para células B.

Tabela 1: Locus gênico, anotação, número de referência no NCBI, função, fragmento selecionado e massa molecular dos fragmentos que compõem a proteína quimérica.

Anotação do genoma cepa 7448	Caraterística/função	Número de referência no NCBI	Fragmento selecionado (aa)	Massa Molecular (kDa)
MHP_0198	P97R1- Adesina P97	YP_287595.1	788 – 915	14
MHP_0513	P46- 46K proteína de superfície de membrana	YP_287902.1	323 – 419	11
MHP_0099	P95- Proteína de membrana externa	YP_287499.1	604 – 750	17
MHP_0067	P42- Chaperona molecular DnaK	YP_287467.1	434 – 600	19

A porção N-terminal do gene correspondente ao fragmento da proteína P97R1 foi fusionado *in frame* com a cauda de histidina (6X his) do vetor pAE e um *linker* flexível de Gly-Gly-Ser-Gly foi incorporado entre as extremidades N e C terminal de cada antígeno. O propósito do *linker* foi separar as proteínas fusionadas a fim de permitir o correto dobramento de cada uma delas. O gene foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (USA) e entregue inserido no vetor de clonagem pBSK. O esquema do cassete de expressão da construção é demonstrado na Figura 1.

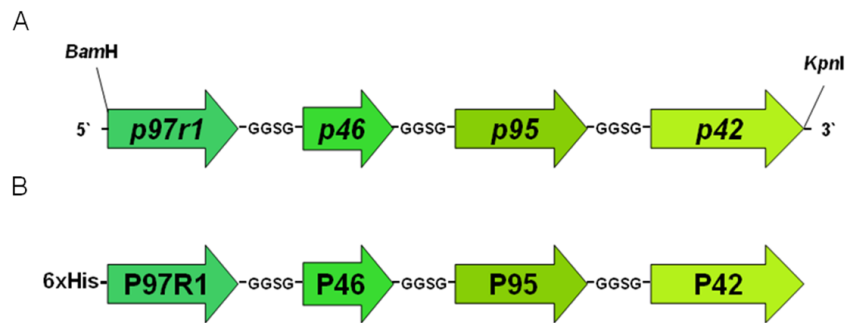


Figura 1. Representação esquemática da construção gênica e da proteína quimérica. (A) Esquema do gene sintético desenhado com sítios para as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I; (B) Esquema da proteína quimérica. Cada um dos quatro antígenos é separado por um *linker* flexível Gly-Gly-Ser-Gly (GGSG).

A eficácia da digestão utilizando as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I foi verificada pela linearização do vetor pAE e liberação do fragmento (inserto) do vetor pBSK com tamanho esperado de 1698 pb (Figura 2).

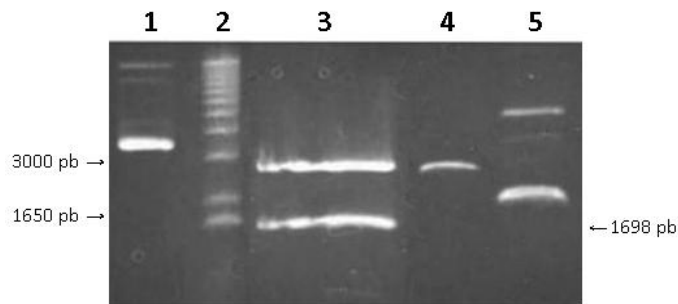


Figura 2. Análise da digestão enzimática dos vetores pBSK/*p97r1p46p95p42* e pAE: eletroforese em gel de agarose 0,8%. 1, pBSK/*p97r1p46p95p42* não digerido; 2, Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 3, pBSK/*p97r1p46p95p42* digerido; 4, pAE digerido; 5, pAE não digerido.

A banda correspondente ao gene sintético foi excisada do gel e após purificação o gene foi clonado no vetor pAE. A transformação de células competentes de *E. coli* TOP 10 com a construção pAE/*p97r1p46p95p42* foi eficiente resultando em oito colônias isoladas.

5.2 Caracterização dos vetores recombinantes

O Microprep realizado para a triagem das colônias bacterianas permitiu a identificação de alguns clones recombinantes, através da visualização em gel de agarose de um padrão de banda mais alto (≈ 4.477 pb) comparado ao vetor pAE sem inserto (≈ 2.822 pb), utilizado como controle (Figura 3). Sete das oito colônias analisadas foram classificadas como prováveis recombinantes.

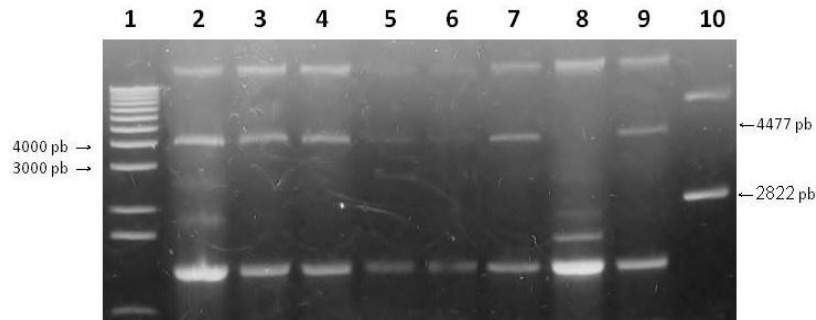


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 0,8% para triagem dos vetores recombinantes. 1, Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); 2-9 transformantes pAE/p97r1p46p95p42; 10, Vetor pAE circular sem inserto.

Os clones selecionados foram propagados e extraídos em quantidade satisfatória (dados não apresentados). Digestão enzimática foi realizada com o objetivo de confirmar a presença do inserto. Todas as sete colônias com tamanho do plasmídeo esperado para a construção pAE/p97r1p46p95p42 tiveram o DNA plasmideal digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I (Figura 4) e foram consideradas recombinantes.

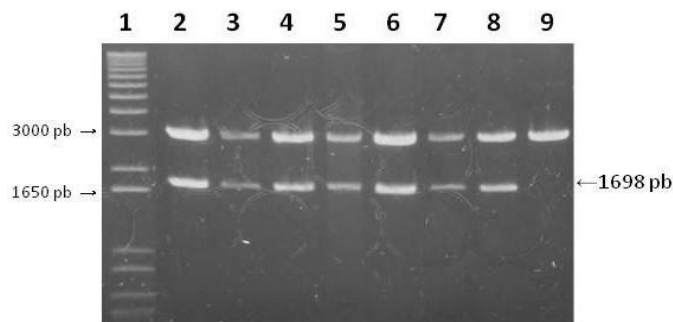


Figura 4. Caracterização enzimática dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1, Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 2-8 clones recombinantes; 9, vetor pAE digerido (controle).

5.3 Produção da proteína quimérica

Quatro clones para a proteína quimérica foram selecionados, transformados e cultivados primeiramente em 10 ml, a fim de avaliar sua expressão e solubilidade. Um dos clones foi selecionado e o mesmo processo foi escalonado para cultivo de 500 ml, sobre as mesmas condições. A expressão da proteína heteróloga e sua solubilidade foi verificada por SDS-PAGE 10% (Figura 5). Os quatro clones selecionados foram capazes de expressar a proteína rP97R1P46P95P42 nas frações solúvel e insolúvel em *E. coli* BL21 Star (DE3), no tamanho esperado de 62 kDa. Após a purificação, a proteína foi dialisada contra tampão PBS, concentrada em polietilenoglicol (PEG) e estocada à -20°C . O rendimento da proteína quimérica na fração solúvel foi de $1,48 \text{ mg.L}^{-1}$. Resultado semelhante foi obtido na recuperação da proteína da fração insolúvel utilizando N-lauroyl sarcosine 0.2%, com aproximadamente $1,74 \text{ mg.L}^{-1}$.

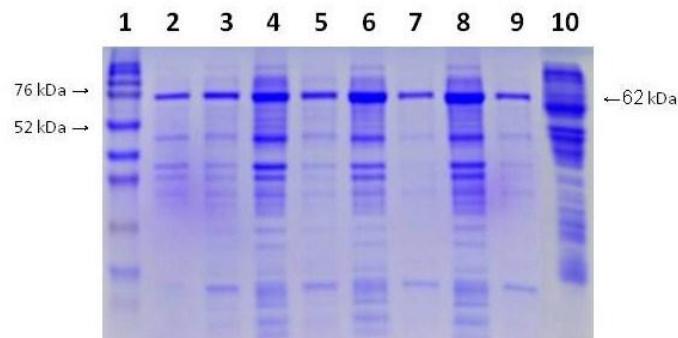


Figura 5. Teste de expressão e solubilidade dos clones recombinantes. SDS-PAGE 10 % dos quatro clones para a proteína quimérica expressa em *E. coli* BL21(DE3) STAR. 1, Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); 2, clone 1 insolúvel; 3, clone 1 solúvel; 4, clone 2 insolúvel; 5, clone 2 solúvel; 6, clone 3 insolúvel; 7, clone 3 solúvel; 8, clone 4 insolúvel; 9, clone 4 solúvel; 10 *E. coli* BL21(DE3) STAR não transformada.

5.4 Caracterização e avaliação da antigenicidade da proteína quimérica

Os dados do *Western blot* e ELISA sugerem que a proteína quimérica manteve os epítomos antigênicos presentes nas proteínas recombinantes não fusionadas e nas proteínas expressas naturalmente durante a infecção. Na análise por *Western blot* a proteína quimérica foi reconhecida no tamanho esperado de 62 kDa pelos anticorpos monoclonais anti-histidina, F1B6 (anti-P97R1), pelo soro

hiperimune de camundongos imunizados contra cada uma das demais subunidades e pelo *pool* de suínos convalescentes (Figura 6). O controle negativo (BSA) não foi reconhecido por nenhum anticorpo.

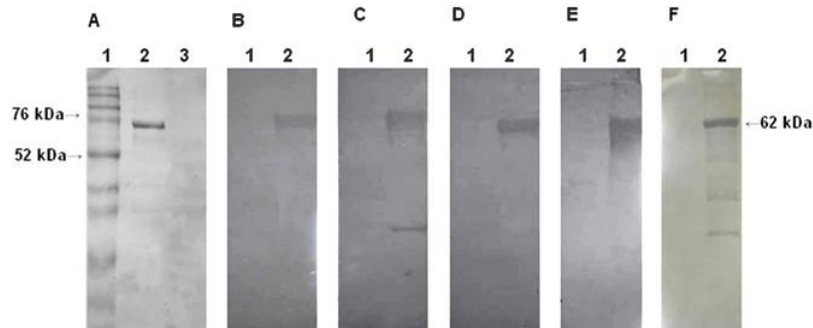


Figura 6. Caracterização da rP97R1P46P95P42 através de *Western blot*. A: WB com mAb anti-6xHis. 1, Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); 2, rP97R1P46P95P42 (62 kDa); 3, BSA (controle negativo). B: WB com mAb F1B6 (anti-R1). 1, BSA (controle negativo); 2, rP97R1P46P95P42. C: WB com soro hiperimune anti-P46. 1, BSA (controle negativo); 2, rP97R1P46P95P42. D: WB com soro hiperimune anti-P95. 1, BSA (controle negativo); 2, rP97R1P46P95P42. E: WB com soro hiperimune anti-P42. 1, BSA (controle negativo); 2, rP97R1P46P95P42. F: WB com soro de suínos convalescentes. 1, BSA (controle negativo); 2, rP97R1P46P95P42.

No ensaio de ELISA indireto a proteína quimérica foi reconhecida pelo soro de suínos convalescentes (Figura 7) provenientes de diferentes rebanhos, comprovando sua antigenicidade na espécie alvo.

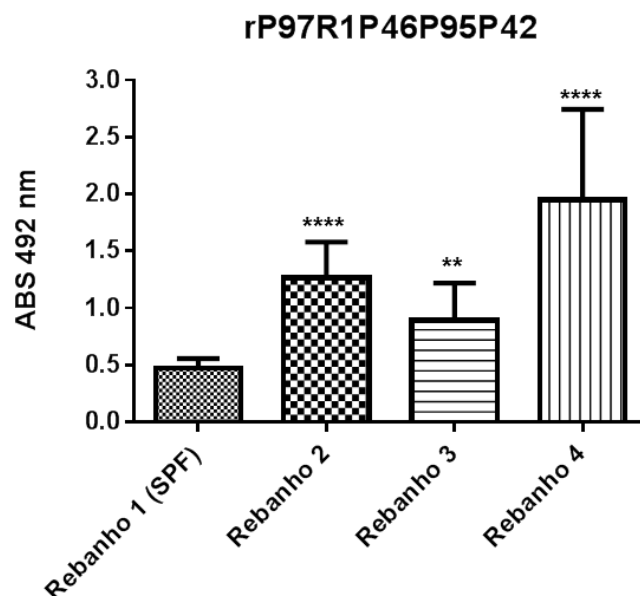


Figura 7. Avaliação da antigenicidade da proteína quimérica por ELISA. Rebanhos 1, soro de suínos SPF obtidos de uma granja em Campos Novos-SC; Rebanho 2, soro de suínos convalescentes obtidos de uma granja de Rio Grande-RS; Rebanho 3, soro de suínos convalescentes obtidos de uma granja de Campos Novos, SC; Rebanho 4, soro de suínos convalescentes obtidos de uma granja de Piratini-RS; ** e ****: proteína quimérica reconhecida pelo soro de suínos convalescentes com diferença estatisticamente significativa comparada aos soros SPF $P<0.01$ e $P<0.0001$, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas com o teste ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni.

6. Discussão

A PES é uma doença crônica e infecciosa de distribuição mundial que acomete principalmente suínos em fase de crescimento e terminação. As vacinas comerciais disponíveis para o controle da doença possuem custo elevado e falham em oferecer proteção completa. Logo, esforços para desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra a PES são necessários. A principal estratégia deste trabalho foi a produção e avaliação da antigenicidade de uma proteína quimérica carreando antígenos fusionados de quatro proteínas imunogênicas de *M. hyopneumoniae*, P97R1, P46, P95 e P42 em uma única formulação. A identificação e caracterização de proteínas imunogênicas de *M. hyopneumoniae* é uma etapa essencial para a produção de vacinas recombinantes experimentais mais eficientes contra a PES. Entretanto um dos grandes desafios para o desenvolvimento das vacinas atuais é o fato de que a maioria das vacinas de subunidade recombinantes monovalentes são pouco imunogênicas (Wilson-Welder et al., 2009). Em muitos ensaios a fusão de diferentes proteínas demonstrou-se eficiente, possibilitando a indução de uma resposta imune potencializada em comparação à imunidade induzida pelas proteínas administradas sozinhas, sugerindo que vacinas multivalentes poderiam oferecer maior proteção (Chen et al., 2008). Estes dados são consistentes com alguns estudos previamente realizados (Conceição et al., 2006; Zhou et al., 2009; Grassmann et al., 2012; D. Liu et al., 2011; Gil et al., 2013) que destacam o desempenho e vantagens de proteínas quiméricas para uso como vacinas recombinantes (Marchioro et al., 2014a).

O evento inicial na colonização de *M. hyopneumoniae* é a sua adesão aos cílios das células epiteliais do trato respiratório dos suínos, que é mediada pela região de repetição R1 da adesina P97 (Minion et al., 2000). Anticorpos monoclonais anti-R1 previamente produzidos, denominados F1B6 e F2G5, bloquearam a aderência de *M. hyopneumoniae* ao cílio suíno em um teste de inibição da aderência *in vitro* (Zhang et al., 1995), sugerindo que a região R1 da adesina P97 possui papel fundamental na patogenia da PES. Outro antígeno importante como alvo vacinal, é a proteína de choque térmico P42, expressa em grande quantidade, exposta na superfície da bactéria e possivelmente envolvida na patogênese da PES (Galli et al., 2012; Simionatto et al., 2012). Estudos demonstraram que a adesina P97R1 e a

chaperona P42, embora imunogênicas, quando administradas individualmente conferiram somente proteção parcial em modelo suíno (Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2010; Jorge et al., 2014). Estes dois antígenos tiveram sua capacidade protetora recentemente avaliada em modelo experimental suíno em outra construção quimérica (Marchioro et al., 2014a.; Marchioro et al., 2014b), entretanto, ofereceram somente proteção parcial contra desafio experimental, embora ambos antígenos tenham sido capazes de induzir elevados níveis de IgA (Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2010; Marchioro et al., 2014a). Além destes alvos, os antígenos P46 e P95, até o momento não tiveram sua imunogenicidade avaliada em suínos; entretanto em ensaios realizados por nosso grupo de pesquisa ambos foram capazes de induzir um mix de resposta imune Th1 e Th2, com elevados níveis de IgG2a e IFN- γ em camundongos (Galli et al., 2012), além de serem fortemente reconhecidos por soros de suínos convalescentes (Simionatto et al., 2012). Portanto, todos os quatro antígenos presentes na proteína quimérica objeto de estudo deste trabalho foram efetivos em induzir forte resposta imune celular e humoral em modelo animal em estudos prévios (Shimoji et al., 2002; Conceição et al., 2006; Chen et al., 2008; Okamba et al., 2010; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Marchioro et al., 2014b).

Estudos prévios têm demonstrado que a expressão dos antígenos utilizados para a construção da proteína quimérica, seja individualmente ou em fusão, ocorre de forma insolúvel (Conceição et al., 2006; Simionatto et al., 2012; Galli et al., 2012; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a.; Marchioro et al., 2014b). A adição do *linker* Gly-Gly-Ser-Gly entre cada um dos fragmentos que compõem a quimera possivelmente influenciou na conformação final da proteína, tornando-a mais estável e facilitando sua expressão de forma solúvel, embora a expressão em corpos de inclusão também tenha ocorrido. Resíduos de glicina foram escolhidos porque não contém aminoácidos de cadeia lateral e assim conferem flexibilidade entre os domínios, permitindo o dobramento correto de cada fragmento da proteína quimérica. Além disso, serinas tem efeitos sobre as taxas de desdobramento e a otimização da junção destes dois *linkers* parece conferir maior estabilidade as proteínas (Robinson & Sauer, 1998). Novos testes para a padronização das condições de cultivo deverão ser realizados a fim de induzir a expressão da proteína quimérica de forma predominantemente solúvel.

A antigenicidade da proteína quimérica foi avaliada pela sua reação com soro de suínos convalescentes, anticorpos monoclonais e soro hiperimune contra cada um dos antígenos que compõem a proteína. As análises por ELISA e *Western blot* demonstraram que a proteína quimérica foi reconhecida pelo soro de suínos convalescentes, indicando que os antígenos presentes na construção são expressos durante a infecção. Proteínas que são fortemente reconhecidas por soros de suínos convalescentes podem desempenhar um papel importante na patogênese da PES e é provável que sejam importantes para a indução de uma resposta imune protetora (Simionatto et al., 2012). Na análise por *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina, anti-R1 (F1B6), soros hiperimunes anti-P46, anti-P95, anti-P42 e um *pool* de soros de suínos convalescentes, todas as subunidades contidas na proteína quimérica foram reconhecidas no tamanho esperado, confirmando a manutenção da antigenicidade das proteínas em detrimento de possíveis alterações em sua estrutura causadas pela fusão. Logo, a manutenção dos epítomos antigênicos presentes na proteína quimérica pode ser um fator determinante na resposta imune induzida por este alvos em ensaios futuros.

Até o momento pouco se conhece sobre a proteção conferida por vacinas contra PES, embora a indução de resposta imune de mucosa, humoral e celular exerça papel fundamental (Thacker et al., 2000; Okamba et al., 2010; Marchioro et al., 2014; Jorge et al., 2014). Todos os antígenos presentes na proteína quimérica rP97R1P46P95P42 já demonstraram capacidade de estimular resposta humoral e celular em estudos anteriores, quando avaliados individualmente ou em fusão. Neste trabalho, uma proteína quimérica composta pelos antígenos P97R1, P46, P95 e P42 de *M. hyopneumoniae* foi construída e clonada no vetor de expressão pAE para *E. coli*. O vetor recombinante obtido demonstrou-se funcional e a proteína quimérica rP97R1P46P95P42 foi expressa nas frações solúvel e insolúvel. Esta construção teve sua antigenicidade confirmada ao reagir com soro de suínos convalescentes para a PES provenientes de diferentes rebanhos e possivelmente com diferentes cepas circulantes, apresentando-se como um promissor candidato vacinal a compor uma vacina mais efetiva visando o controle da doença. Futuramente, a proteína quimérica terá o seu potencial imunogênico avaliado em modelo experimental, e sua capacidade imunoprotetora testada em suínos, através de desafio experimental.

7. Conclusão

- A construção *in silico* do gene codificante para a proteína quimérica foi eficiente e a clonagem realizada com sucesso no vetor de expressão pAE.

- A expressão da proteína quimérica em sistema procarioto utilizando a cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) foi eficiente.

- Todas as subunidades da proteína quimérica foram reconhecidas por anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, produzidos contra cada um destes antígenos.

- A proteína quimérica rP97R1P46P95P42 foi reconhecida por soro suínos convalescentes, demonstrando que a mesma manteve os epítomos antigênicos e que os antígenos presentes na construção são expressos durante a infecção.

- Ensaios futuros serão realizados com o objetivo de avaliar o potencial imunogênico e imunoprotetor da quimera rP97R1P46P95P42 como candidato vacinal contra PES, em modelo animal.

8. Referências

- ADAMS, C., PITZER, J. & MINION, F.. (2005). In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity*. 73. p. 7784–7787.
- ARMSTRONG, C.H., SCHEIDT, A B., THACKER, H.L., RUNNELS, L.J. & FREEMAN, M.J. (1984). Evaluation of criteria for the postmortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Canadian journal of comparative medicine (Gardenvale, Quebec)*. 48(3). p. 278–281.
- BAI, F., NI, B., LIU, M., FENG, Z., XIONG, Q., XIAO, S. & SHAO, G. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 155(3). p. 155–161.
- BARCELLOS, D.E.S.N., BOROWSKI, S. M. & ALMEIDA, M.N. (2007). Programas de vacinação para diferentes sistemas de produção. In *Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*. p. 54–67.
- BOGEMA, D.R., SCOTT, N.E., PADULA, M.P., TACCHI, J.L., RAYMOND, B.B. A, JENKINS, C., CORDWELL, S.J., MINION, F.C., WALKER, M.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2011). Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. 286(48). p. 41217–41229.
- BURCH, D.G.S. (2004). The comparative efficacy of antimicrobials for the prevention and treatment of enzootic pneumonia and some of their pharmacokinetic/ pharmacodynamic relationships. . p. 8–27.
- CAI, H.Y., VAN DREUMEL, T., MCEWEN, B., HORNBY, G., BELL-ROGERS, P., MCRAILD, P., JOSEPHSON, G. & MAXIE, G. (2007). Application and Field Validation of a PCR Assay for the Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from Swine Lung Tissue Samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19(1). p. 91–95..
- CALSAMIGLIA, M., PIJOAN, C. & TRIGO, A. (1999). Application of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay to Detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from Nasal Swabs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11(3). p. 246–251.
- CARON, J., OUARDANI, M. & DEA, S. (2000). Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(4). p. 1390–1396.
- CASTRO, L.A. DE (2008). The sequencing of the genome of *Mycoplasma hyopneumoniae* and its repercussion in pig production. . 36(Supl 1). p. 101–106.

- CHAE, C. (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Veterinary Journal*. 169(3). p. 326–336.
- CHEN, A.Y., FRY, S.R., DAGGARD, G.E. & MUKKUR, T.K.S. (2008). Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine*. 26(34). p. 4372–4378.
- CHEN, A.Y., FRY, S.R., FORBES-FAULKNER, J., DAGGARD, G. & MUKKUR, T.K.S. (2006). Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 55(7). p. 923–929..
- CHEN, Y.L., WANG, S.N., YANG, W.J., CHEN, Y.J., LIN, H.H. & SHIUAN, D. (2003). Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infection and Immunity*. 71(3). p. 1155–1160.
- CHOI, C., KWON, D., JUNG, K., HA, Y., LEE, Y.H., KIM, O., PARK, H.K., KIM, S.H., HWANG, K.K. & CHAE, C. (2006). Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of comparative pathology*. 134(1). p. 40–46.
- CITTI, C. & BLANCHARD, A. (2013). Mycoplasmas and their host: Emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*. 21(4). p. 196–203.
- CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2006). Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. . (53). p. 1034–1042.
- CONCEIÇÃO, F.R., MOREIRA, Â.N. & DELLAGOSTIN, O.A. (2006). A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine*. 24(29-30). p. 5734–5743..
- DAMTE, D., LEE, S.-J., HWANG, M.-H., GEBRU, E., CHOI, M.-J., LEE, J.-S., CHENG, H. & PARK, S.-C. (2011). Inflammatory responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in murine alveolar macrophage cell lines. *New Zealand veterinary journal*. 59(4). p. 185–90.
- DEBEY, M.C. & ROSS, R.F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity*. 62(12). p. 5312–5318.
- DREXLER, H.G. & UPHOFF, C.C. (2003). Mycoplasma contamination of cell cultures : Incidence , sources , effects , detection , elimination , prevention. . (Table 1). p. 75–90.
- DUBOSSON, C.R., CONZELMANN, C., MISEREZ, R., BOERLIN, P., FREY, J., ZIMMERMANN, W., HÄNI, H. & KUHNERT, P. (2004). Development of two real-time PCR assays for

- the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Veterinary microbiology*. 102(1-2). p. 55–65.
- DYBVIG, K. & VOELKER, L.L. (1996). Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.* 50. p. 25–57.
- FAGAN, P.K., WALKER, M.J., CHIN, J., EAMENS, G.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microbial pathogenesis*. 30(2). p. 101–10.
- FRIIS, N.F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord. Vet. Med.* 27. p. 337–339.
- GALLI, V., SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O. A. (2012). Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine*. 31(1). p. 135–140.
- GIL, L. A F., DA CUNHA, C.E.P., MOREIRA, G.M.S.G., SALVARANI, F.M., ASSIS, R. A., LOBATO, F.C.F., MENDONÇA, M., DELLAGOSTIN, O. A. & CONCEIÇÃO, F.R. (2013). Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D. *PLoS ONE*. 8(7). p. E69692.
- GRASSMANN, A. A, FÉLIX, S.R., DOS SANTOS, C.X., AMARAL, M.G., SEIXAS NETO, A.C.P., FAGUNDES, M.Q., SEIXAS, F.K., DA SILVA, E.F., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O. A (2012). Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clinical and vaccine immunology: CVI*. 19(5). p. 740–5.
- HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., CHIERS, K., MAES, D., DUCATELLE, R. & DECOSTERE, A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? *Veterinary Microbiology*. 100(3-4). p. 255–268.
- HWANG, M., CHANG, H.-Q., KANG, E.-H., LIM, J.-H., YUN, H.-I., MAN-HEE, R., JEONG, Y.-S. & SEUNG-CHUN, P. (2008). Surfactin C inhibits *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced transcription of proinflammatory cytokines and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells. *Biotechnol Lett*. 30. p. 229–233.
- JORGE, S., OLIVEIRA, N.R. DE, MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., HARTLEBEN, C.P. & DELLAGOSTIN, O.A. (2014). The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. *Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases* . 37. p. 229–236.
- JOUGLARD, S.D.M.M.A., VAZ, E.K., BASTOS, R.G., DA CUNHA, C.W. & ARMOA, G. R. G. DELLAGOSTIN, O.A. (2002). An ultra-rapid and inexpensive plasmid

- preparation method for screening recombinant colonies. *Abstracts American Society for Microbiology*. 71. p. 234.
- KAVANAGH, N.T. (1994). The effect of pulse medication with combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia. *International Veterinary Journal*. 57. p. 58–61.
- KING, W., JR, J.Y. & ROSEY, L. (1997). Characterization of the gene encoding Mhpl from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhpl 's vaccine potential. . 15(1). p. 25–35.
- KURTH, K.T., HSU, T., SNOOK, E.R., THACKER, E.L., THACKER, B.J. & MINION, F.C. (2002). Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* Nested Polymerase Chain Reaction Test to Determine the Optimal Sampling Sites in Swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 14(6). p. 463–469.
- KWON, D., CHOI, C. & CHAE, C. (2002). Chronologic Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs. *Veterinary Pathology*. 39(5). p. 584–587.
- LILJEQVIST, S. & STAHL, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. . 73. p. 1–33.
- LIN, J.H., WENQ, C.N., LIAO, C.W., YEH, K.S. & PAN., M.J. (2003). Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 65. p. 69–74.
- LIU, D., WANG, X., GE, J., LIU, S. & LI, Y. (2011). Comparison of the immune responses induced by oral immunization of mice with *Lactobacillus casei*-expressing porcine parvovirus VP2 and VP2 fused to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 34(1). p. 73–81.
- LIU, W., FENG, Z., FANG, L., ZHOU, Z., LI, Q., LI, S., LUO, R., WANG, L., CHEN, H., SHAO, G. & XIAO, S. (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *Journal of Bacteriology*. 193. p. 1016–1017.
- LIU, W., XIAO, S., LI, M., GUO, S., LI, S., LUO, R., FENG, Z., LI, B., ZHOU, Z., SHAO, G., CHEN, H. & FANG, L. (2013). Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC genomics*. 14(1). p. 80.
- MAES, D., DELUYKER, H., VERDONCK, M., CASTRYCK, F., MIRY, C., VRIJENS, B., VERBEKE, W., VIAENE, J. & DE KRUIF, A. (1999). Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine*. 17(9-10). p. 1024–1034.

- MAES, D., SEGALÉS, J., MEYNS, T., SIBILA, M., PIETERS, M. & HAESEBROUCK, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*. 126(4). p. 297–309.
- MAES, D., VERDONCK, M., DELUYKER, H. & DE KRUIF, A (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *The Veterinary quarterly*. 18(3). p. 104–109.
- MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., JORGE, S., GALLI, V., HAESEBROUCK, F., MAES, D., DELLAGOSTIN, O. & CONCEIÇÃO, F.R. (2014a). Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTB. *Veterinary microbiology*. 173(1-2). p. 166–71.
- MARCHIORO, S.B., MAES, D., FLAHO, B., PASMANS, F., DEL POZO SACRISTÁN, R., VRANCKX, K., MELKEBEEK, V., COX, E., WUYTS, N. & HAESEBROUCK, F. (2013). Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine*. 31(9). p. 1305–1311.
- MARCHIORO, S.B., SÁCRISTAN, R.D.P., MICHIELS, A., HAESEBROUCK, F., CONCEIÇÃO, F.R., DELLAGOSTIN, O. A & MAES, D. (2014b). Immune responses of a chimaeric protein vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTB against experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine*. 32(36). p. 4689–94.
- MARCHIORO, S.B., SIMIONATTO, S., GALLI, V., CONCEIÇÃO, F.R., BRUM, C.B., FISCH, A., GOMES, C.K. & DELLAGOSTIN, O. A (2012). Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary microbiology*. 155(1). p. 44–52.
- MAROIS, C., CARROU, J. LE & KOBISCH, M. (2007). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. . 120. p. 96–104.
- MATTSSON, J.G., BERGSTROM, K., WALLGREN, P.E.R. & JOHANSSON, K. (1995). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Nose Swabs from Pigs by In Vitro Amplification of the 16S rRNA Gene. 33(4). p. 893–897.
- MINION, F.C., ADAMS, C. & HSU, T. (2000). R1 Region of P97 Mediates Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Swine Cilia. . 68(5). p. 3056–3060.
- MINION, F.C., LEFKOWITZ, E.J., MADSEN, M.L., CLEARY, B.J., SWARTZELL, S.M. & MAHAIRAS, G.G. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of bacteriology*. 186(21). p. 7123–33.
- MUNETTA, Y., MINAGAWA, Y., SHIMOJI, Y., OGAWA, Y. & HIKONO, H. (2008). Immune Response of Gnotobiotic Piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunology. J. Vet. Med. Sci.* 70(10) p.1065-1070.

- OKADA, M., ASAI, T., ONO, M., SAKANO, T. & SATO, S. (2000). Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine*. 18. p. 2825–2831.
- OKADA, M., SAKANO, T., SENNA, K., MARUYAMA, T. & MUROFUSHI, J. (1999). Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* Inactivated Vaccine in Pigs under Field Conditions. *J. Vet. Med. Sci.* 61(10).p.1131–1135.
- OKAMBA, F.R., ARELLA, M., MUSIC, N., JUN, J., GOTTSCHALK, M. & GAGNON, C.A. (2010). Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine*. 28. p. 4802–4809.
- OTAKE, S., DEE, S., CORZO, C., OLIVEIRA, S. & DEEN, J. (2010). Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology*. 145(3-4). p. 198–208.
- PIJOAN, C. (2005). A controversial view of *Mycoplasma hyopneumoniae* epidemiology. In Allen D. Leman Swinw Conference, p. 114–117.
- RAMOS, C.R.R. (2004). A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37. p. 1103–1109.
- RAPPUOLI, R. (2001). Reverse vaccinology , a genome-based approach to vaccine development. 19. p. 2688–2691.
- RAZIN, S. & YOGEV, D. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. . 62(4). p. 1094–1156.
- ROBINSON, C.R. & SAUER, R.. (1998). Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*95. p. 5929–5934
- ROBINSON, M.W., BUCHTMANN, K.A., JENKINS, C., TACCHI, J.L., RAYMOND, B.B.A., TO, J., CHOWDHURY, P.R., WOOLLEY, L.K., LABBATE, M., TURNBULL, L., CB, W., MP, P., ROBINSON, M.W., BUCHTMANN, K.A., TACCHI, J.L., RAYMOND, B.B.A., WOOLLEY, L.K., LABBATE, M., TURNBULL, L., ET AL. (2013). MHJ _ 0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol.* 3.p. 1-15
- ROSS, R.F. (2007). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Animal Health Research Reviews*. 7(1/2). p. 13–29

- ROSS, R.F., LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D. MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C. & SCHOLL, E. (1986). Diseases of swine. *The Iowa State University Press*. p. 469–483.
- RUIZ, A., GALINA, L. & PIJOAN, C. (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars Résumé. . p. 79–85.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. (2001). Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3.pdf. *Human Mutation*. 18. p. 1–2231.
- SARRADELL, J., ANDRADA, M., RAMIREZ, A.S., FERNANDEZ, A., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C., JOVER, A., LORENZO, H., HERRAEZ, P. & RODRIGUEZ, F. (2003). Morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Pathology*. 40. p. 395– 404.
- SHIMOJI, Y., OISHI, E., KITAJIMA, T., MUNETA, Y., SHIMIZU, S. & MORI, Y. (2002). Erysipelothrix rhusiopathiae YS-1 as a Live Vaccine Vehicle for Heterologous Protein Expression and Intranasal Immunization of Pigs. . 70(1). p. 226–232.
- SHIMOJI, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., NOSAKA, H. & MORI, Y. (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine*. 21. p. 532–537.
- SIBILA, M., BERNAL, R., TORRENTS, D., RIERA, P. & LLOPART, D. (2008). Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion , and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary Microbiology* . 127. p. 165–170.
- SIBILA, M., NOFRARÍAS, M., S, L.-S., SEGALÉS, J., VALERO, O., ESPINAL, A. & CALSAMIGLIA, M. (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection , seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. . 122. p. 97–107.
- SIBILA, M., PIETERS, M., MOLITOR, T. & MAES, D. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal*. 181. p. 221–231.
- SIMIONATTO, S., BEUTINGER, S. & MAES, D. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. *Veterinary Microbiology*.165(3-4). p. 234-242.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., BRUM, C.B., KLEIN, C.S., REBELATTO, R., SILVA, E.F., BORSUK, S. & CONCEIC, F.R. (2012). Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 35. p. 209–216.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., HARTWIG, D.D., CARLESSI, R.M., MUNARI, F.M., LAURINO, J.P., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2010). Cloning and

- purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 69(2). p. 132–136.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., LUERCE, T.D., HARTWIG, D.D., MOREIRA, Â.N. & DELLAGOSTIN, O.A. (2009). Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. 79(1). p. 101–105.
- SIQUEIRA, F.M., THOMPSON, C.E., VIRGINIO, V.G., GONCHOROSKI, T., REOLON, L., ALMEIDA, L.G., MARIA, M., SOUZA, R. DE, PROSDOCIMI, F., SCHRANK, I.S., FERREIRA, H.B., TEREZA, A. & VASCONCELOS, R. DE (2013). New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics*. p. 1–17.
- SIRAND-PUGNET, P., CITTI, C., BARRÉ, A. & BLANCHARD, A. (2007). Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in microbiology*. 158(10). p. 754–66.
- SOBESTIANSKY, J. (1999). Pneumonia Enzoótica. In *Clínica e patologia suína*. 2nd ed., Goiânia, Goiás: rt 3 Impressos Especiais, p. 359.
- SORIA-GUERRA, R.E., MORENO-FIERROS, L. & ROSALES-MENDOZA, S. (2011). Two decades of plant-based candidate vaccines: a review of the chimeric protein approaches. *Plant Cell Reports*. 30. p. 1367–1382.
- STAKENBORG, T., VICCA, J., MAES, D., PEETERS, J., DE KRUIF, A., HAESEBROUCK, F. & BUTAYE, P. (2006). Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Journal of microbiological methods*. 66(2). p. 263–75.
- STRAIT, E.L., MADSEN, M.L., MINION, F.C., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., DAMMEN, M., JONES, K.R. & THACKER, E.L. (2008). Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 46(8). p. 2491–8.
- THACKER, E. (2006). Mycoplasmal diseases. In B. E. STRAW et al. (eds.). *Diseases of Swine*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p. 701–717.
- THACKER, E., THACKER, B., KUHN, M., HAWKINS, P. & WATERS, W. (2000). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Veterinary Medical Research Institute*. 61(11). p. 1384–1389.
- THACKER, E.L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 5(2). p. 317–320.
- THACKER, E.L., THACKER, B.J., BOETTCHER, T.B. & JAYAPPA, H. (1998). Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health and Production*. 6(3). p. 107–112.

- VASCONCELOS, A.T.R., FERREIRA, H.B., BIZARRO, C. V, BONATTO, S.L., CARVALHO, M.O., PINTO, P.M., ALMEIDA, D.F., ALMEIDA, L.G.P., ALMEIDA, R., ALVES-FILHO, L., ASSUNC, E.N., BOGO, R., BRIGIDO, M.M., BROCCHI, M., BURITY, H.A., CAMARGO, A.A., CAMARGO, S.S., CAREPO, M.S., CARRARO, D.M., ET AL. (2005). Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*. 187(16). p. 5568–5577.
- VERDIN, E., SAILLARD, C., LABBÉ, A., BOVE, J.M. & KOBISCH, M. (2000). A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Veterinary Microbiology*. 76. p. 31–40.
- VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., DE KRUIF, A & HAESEBROUCK, F. (2004). In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48(11). p. 4470–2.
- VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., DE KRUIF, A. & HAESEBROUCK, F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology*. 97. p. 177–190.
- VRANCKX, K., MAES, D., CALUS, D., VILLARREAL, I., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. (2011). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(5). p. 2020–2023.
- WALKER, R.. (2003). Mollicutes. In D. C. HIRSH & Y. . ZEE (eds.). *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 155–162.
- WILSON-WELDER, J.H., TORRES, M.P., KIPPER, M.J., MALLAPRAGADA, S.K., WANNEMUEHLER, M.J. & NARASIMHAN, B. (2009). Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *Journal of pharmaceutical sciences*. 98(4). p. 1278–316.
- ZHANG, Q., YOUNG, T.F. & ROSS, R.F. (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infection and Immunity*. 63. p. 1013–1019.
- ZHOU, W.-Y., SHI, Y., WU, C., ZHANG, W.-J., MAO, X.-H., GUO, G., LI, H.-X. & ZOU, Q.-M. (2009). Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine*. 27(36). p. 5013–9.