

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

**ORGANIZAÇÃO DAS UNIDADES DE
TRANSCRIÇÃO EM *Mycoplasma hyopneumoniae***

Dissertação de Mestrado

Franciele Maboni

Porto Alegre, fevereiro de 2010

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

**ORGANIZAÇÃO DAS UNIDADES DE
TRANSCRIÇÃO EM *Mycoplasma hyopneumoniae***

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

Franciele Maboni

Orientadora: Prof^a Dr^a Irene Silveira Schrank

Porto Alegre, fevereiro de 2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microrganismos Diazotróficos, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à professora Irene Silveira Schrank, pela acolhida, confiança, e principalmente, pelos ensinamentos;

Aos professores Arnaldo Zaha, Augusto Schrank, Henrique Ferreira e Marilene Vainstein, os quais considero meus “co-orientadores”. Obrigada, acima de tudo, pela oportunidade de convívio e aprendizado;

Aos funcionários e prestadores de serviços do Cbiot, em especial à Grasiela, pela disponibilidade em ajudar sempre;

Aos secretários do PPGBCM, Luciano e Sílvia, por estarem sempre à disposição nas horas em que mais precisamos, além é claro, do grande carinho e amizade;

Aos colegas do Laboratório 222, pelo compartilhamento de conhecimentos, discussões de metodologias, e amizade;

A todos os colegas dos Laboratórios 116, 207, 210, 217 e 220;

Aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim e incentivaram minhas decisões. Em especial, à D. Vera e S. Beto não apenas pelo incentivo financeiro, mas principalmente, pelo amor, carinho, paternalismo e motivação. Sem o apoio de vocês muitas coisas não seriam possíveis em nossas vidas;

Ao Henrique, agradeço pelo amor, carinho e atenção, em todos estes anos.

Aos órgãos financiadores, pelo auxílio financeiro para a execução do trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. O gênero <i>Mycoplasma</i> sp.	13
1.2. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	15
1.3. Transcrição em <i>Mycoplasma</i> sp.	16
1.4. Unidades de transcrição.....	18
1.5. Unidades de transcrição em <i>Mycoplasma</i> sp.....	21
1.6. Unidades de transcrição: Estudos experimentais e <i>in silico</i>	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Análise <i>in silico</i> das unidades de transcrição	27
3.2. Cultivo de <i>M. hyopneumoniae</i>	27
3.3. Isolamento de DNA e RNA.....	27
3.4. Construção dos <i>primers</i>	28
3.5. Amplificação de mRNA policistrônico	28
3.5.1. Síntese de cDNA	28
3.5.2. Amplificação do cDNA por PCR.....	29
3.5.3. Sequenciamento automático e análise dos dados	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Análise <i>in silico</i> das unidades de transcrição no genoma de <i>M. hyopneumoniae</i>	32
4.2. Análise experimental das unidades de transcrição no genoma de <i>M. hyopneumoniae</i>	33
5. DISCUSSÃO.....	41
6. PERSPECTIVAS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	57
ANEXO A - Protocolo de extração de DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i>	58
ANEXO B - Gel desnaturante de formaldeído	59
APÊNDICES.....	60

APÊNDICE A - <i>Primers</i> empregados nos experimentos de RT-PCR.	61
APÊNDICE B: Unidades de transcrição de <i>M. hyopneumoniae</i> confirmadas experimentalmente.....	65
APÊNDICE C - ORFs transcritas em mRNA monocistrônico em <i>M. hyopneumoniae</i> ..	69
CURRICULUM VITAE	70

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	DNA complementar
CDS	sequência codificante
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	trifosfato de desoxirribonucleosídeo
DPEC	dietilpirocarbonato
DTT	ditiotretitol
fmol	fentomol
Kb	quilobase
µg	micrograma
µl	microlitro
LD PCR	reação em cadeia com a polimerase de longa distância
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
MOPS	3-[N-morfolino] ácido propanosulfônico
NaCl	cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanograma
ORF	região aberta de leitura

pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativo, ou PCR em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	PCR com transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	Tris-HCl/EDTA
Tm	temperatura de desnaturação
U	unidade
UT	unidade de transcrição
UFC	unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Colônia de <i>Mycoplasma</i>	13
Figura 3.1: Unidade de transcrição em <i>M. hyopneumoniae</i>	28
Figura 4.1: Predição <i>in silico</i> das unidades de transcrição no genoma de <i>M. hyopneumoniae</i>	32
Figura 4.2: Modelo da confirmação experimental das unidades de transcrição de <i>M. hyopneumoniae</i>	34
Figura 4.3: Representação global das unidades de transcrição no genoma de <i>M. hyopneumoniae</i>	36
Figura 4.4: Regiões intergênicas das unidades de transcrição analisadas em <i>M. hyopneumoniae</i>	38
Figura 4.5: Distribuição das unidades de transcrição em três diferentes genomas de <i>M. hyopneumoniae</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Descrição dos moldes usados nas reações para cada par de <i>primers</i>	29
Tabela 3.2: Condições gerais de amplificação das reações de PCR.....	30

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente causador da pneumonia enzoótica suína, uma enfermidade de distribuição mundial responsável por consideráveis perdas econômicas. Em organismos procariotos, a organização das ORFs em UTs e os mecanismos de regulação da expressão gênica são bem caracterizados. No entanto, no gênero *Mycoplasma* existem poucas informações relacionadas a transcrição gênica. Em *M. hyopneumoniae*, mesmo com os dados de sequenciamento de três genomas completos, poucos são os estudos englobando transcrição, bem como organização das unidades transcricionais. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a distribuição e organização gênica em *M. hyopneumoniae* através da análise *in silico* e determinação experimental, pela técnica de RT-PCR, das unidades de transcrição. As análises *in silico* das UTs foram realizadas utilizando dois critérios: inicialmente, foi estabelecido como distância intergênica máxima, um tamanho de até 100 pb; posteriormente, foi utilizado o critério de genes organizados na mesma fita de DNA, independente das distâncias entre eles. *Primers* localizados entre a região 3' de uma ORF e a região 5' da ORF adjacente foram empregados, na técnica de RT-PCR, para demonstrar a co-transcrição de ORFs. As análises *in silico* determinaram a presença de 112 UTs, sendo que 21 destas UTs foram confirmadas experimentalmente. O tamanho e a composição das UTs são extremamente variáveis, assim como, as distâncias das regiões intergênicas entre as ORFs e os produtos codificados por elas. A partir dos resultados deste trabalho é possível sugerir que, em *M. hyopneumoniae*, a transcrição ocorre de forma contínua na mesma fita de DNA, formando assim, extensas UTs, as quais são interrompidas quando da presença de UTs ou ORFs individuais na orientação oposta.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is the agent of enzootic pneumonia, a chronic respiratory disease present in the majority of swine herds throughout the world being considered an important pathogen in the swine industry. In prokaryotic organisms the ORFs arrangement in UTs and the gene expression regulation are well characterized. However, in the *Mycoplasma* genus there is little information related to gene transcription. Three complete genomes of *M. hyopneumoniae* were sequenced, but there are few studies encompassing transcription and organization of UTs. This work aims to characterize the distribution and gene organization in *M. hyopneumoniae* genome by *in silico* and experimental analyze of the UTs. The *in silico* analysis of the UTs were performed using two criteria: first, was established up to 100 bp as a maximum size of the intergenic distance and, later we used the criterion of genes arranged in the same DNA strand, regardless of the distances between them. To demonstrate the co-transcription of two ORFs the RT-PCR technic was used with primers located between the 3' region of an ORF and the 5' region of the adjacent ORF. The *in silico* analysis showed 112 UTs. Twenty-one UTs were experimentally confirmed by RT-PCR. The size and composition of the UTs are extremely variable, as well as the distances of the intergenic regions between the ORFs, and the products encoded by them. The findings of this study can suggest that in *M. hyopneumoniae* transcription occurs continuously in the same DNA strand, thus forming large UTs, which are disrupted in the presence of UTs or individual ORFs in the opposite orientation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Mycoplasma* sp.

Os microrganismos do genero *Mycoplasma*, do grego *mykes* (fungo) e *plasma* (moldável), pertencem a família *Mycoplasmataceae*, classe *Mollicutes*, do latim *mollis* (mole) e *cutis* (pele). Esta classificação ocorre, principalmente, pela ausência de parede celular (RAZIN *et al.*, 1998). Devido ao fato de não sintetizarem peptidoglicano, ou seus precursores, não possuem parede celular rígida, mas sim, uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, fosfolipídeos e colesterol, sendo este último, o responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. Os micoplasmas são pleomórficos em função da ausência de parede celular. A célula pode ser esférica, em forma de pera, em forma de espiral ou filamentosa. Estes microrganismos se multiplicam lentamente em meio de cultura após incubação de 3 a 20 dias, a uma temperatura ótima de 37 °C, pH em torno de 7,5, em atmosfera de 5 a 10% CO₂ e leve agitação (WALKER, 2003) (Figura 1.1).

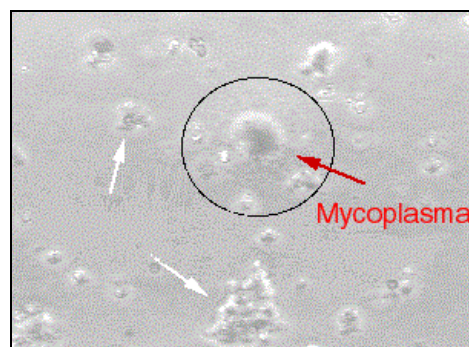


Figura 1.1: Colônia de *Mycoplasma*. A figura ilustra uma cultura com o crescimento de uma colônia de *Mycoplasma* circulada em preto. As flechas brancas indicam detritos celulares na cultura, os quais devem ser avaliados com atenção, para não confundir o diagnóstico.

O genero *Mycoplasma* está amplamente distribuído no reino animal, parasitando mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (PITCHER & NICHOLAS, 2005). Normalmente, estão aderidos à superfície extracelular de células e tecidos do hospedeiro, embora já tenham sido descritas algumas espécies ocupando o interior de células eucarióticas (LO *et al.*, 1993; BASEMAN *et al.*, 1995). Podem ser patogênicos ou apenas

fazerem parte da microbiota do trato respiratório e/ou urogenital (RAZIN, 2006). Em humanos, estão relacionados a enfermidades como asma, câncer, doenças auto-imunes, artrite e pneumonia (BASEMAN & TULLY, 1997).

Quanto à classificação morfológica, são bactérias gram-negativas, pois apresentam apenas uma membrana plasmática, sem a proteção adicional de uma parede celular (RAZIN, 2006). Entretanto, filogeneticamente, os micoplasmas estão relacionados às bactérias gram-positivas, compartilhando, deste modo, um ancestral em comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF *et al.*, 2004). Possivelmente, a evolução dos micoplasmas ocorreu através de eventos de degeneração ou redução do genoma de bactérias gram-positivas portadoras de baixo conteúdo de guanina e citosina (G+C) (WOESE, 1987).

Os genomas destes microrganismos são extremamente reduzidos, variando de 580 a 1.350 kb (FRASER *et al.*, 1995; SASAKI *et al.*, 2002) e apresentam baixo conteúdo de G+C, entre 23 e 40% (WOESE, 1987). As regiões intergênicas têm um maior conteúdo de adenina e timina (A+T) em relação às regiões codificantes (DYBVIK & VOELKER, 1996). A distribuição de G+C ocorre de forma irregular, sendo estas bases mais frequentes em genes que codificam RNAs ribossômicos e transportadores (FRASER *et al.*, 1995). Como resultado desta composição atípica dos genomas, há o favorecimento da utilização de códons que contêm A+T (BOVE, 1993). Consequentemente, micoplasmas possuem pouquíssimos códons GGN, CCN, GCN e CGN (RAZIN, 2006). Outra particularidade que parece estar ligada a essa questão, é a utilização do códon UGA (OSAWA *et al.*, 1992), que não é utilizado como códon de terminação, conforme o código genético universal, mas codifica o aminoácido triptofano (YAMAOKA *et al.*, 1985), característica que é igualmente encontrada em genomas mitocondriais.

Esses microrganismos não possuem muitas das vias enzimáticas características da maioria das bactérias, provavelmente, devido ao seu genoma reduzido. Como exemplos disso, podemos ressaltar a ausência de vias *de novo* na biossíntese de purinas, um ciclo do ácido tricarboxílico completo e um sistema de cadeia transportadora de elétrons mediada por citocromo (MANOLUKAS *et al.*, 1988; FINCH & MITCHELL, 1992; POLLACK, 1992; FRASER *et al.*, 1995). Isso estaria relacionado ao fato da maioria dos micoplasmas serem parasitas hospedeiro e tecido específicos (RAZIN *et al.*, 1998; ROTTEM & YOGEV, 2000).

1.2. *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES) – doença respiratória infecciosa crônica, caracterizada pela alta morbidade e baixa mortalidade (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). A PES ocorre em âmbito mundial, estando presente em quase todos os rebanhos suínos (MINION *et al.*, 2004). Por determinar significativos gastos com medicamentos, atraso no ganho de peso, condenação de órgãos e carcaça e, por fim, menores valores de venda, a PES é a maior causa de perdas econômicas na produção suinícola intensiva (THACKER, 2006).

Os cultivos de *M. hyopneumoniae* são lentos quando comparados aos de outras espécies de micoplasmas suínos. O microrganismo se multiplica em meio sólido somente na presença de 5 a 10% de CO₂. FRIIS (1975) desenvolveu um meio especial para isolamento de *M. hyopneumoniae* e *Mycoplasma hyorhinis*, o qual possui como indicador de pH o vermelho de fenol. A multiplicação bacteriana é visível quando ocorre a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, indicando a oxidação da glicose e produção de ácido.

M. hyopneumoniae é um patógeno extracelular que coloniza o trato respiratório através da aderência às células do epitélio ciliar (DEBEY *et al.*, 1992). Como demonstrado por ZIELINSKI *et al.* (1990), essa aderência é essencial para que ocorra a multiplicação do organismo. O estabelecimento da infecção resulta em ciliostase, perda dos cílios, morte das células epiteliais e inflamação aguda na traquéia, brônquios e bronquíolos. Conseqüentemente, ocorre uma redução na eficiência do sistema mucociliar e diminuição da resistência imunológica, predispondo os animais à infecções secundárias (CIPRIAN *et al.*, 1988; DJORDJEVIC *et al.*, 2004).

Devido principalmente, ao impacto econômico causado pela PES, muitos esforços são destinados aos estudos do agente *M. hyopneumoniae*. É neste contexto que a Rede Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural (PIGS, www.genesul.lncc.br) tem se empenhado tanto em estudos moleculares, quanto funcionais deste microrganismo. Assim, até o momento, três cepas de *M. hyopneumoniae* já tiveram seus genomas completamente sequenciados, sendo a cepa J e a 7448 pelo grupo PIGS (VASCONCELOS *et al.*, 2005) e a cepa 232 por MINION *et al.* (2004). Além disso, encontra-se em fase final

de sequenciamento o genoma de outra cepa, a 7422, pelo grupo PIGS, A. Zaha (comunicação pessoal).

1.3. Transcrição em *Mycoplasma* sp.

Em virtude da relevância médica e veterinária, os micoplasmas apresentam grande importância. Estes microrganismos têm ainda despertado interesses por possuírem genoma extremamente reduzido, fazendo com que sejam objetos de estudos na determinação do conjunto mínimo de genes necessários para o estabelecimento de vida independente (GIL *et al.*, 2004). Sendo assim, dezenove espécies desse gênero tiveram seus genomas sequenciados, até o momento (NCBI, 2010).

Em genomas bacterianos, o número de genes anotados, envolvidos com a transcrição, varia entre as sequências analisadas. Em micoplasmas, o total de ORFs envolvidas na transcrição varia entre 11 a 23, o que representa 2 a 3% do total de CDSs (SASAKI *et al.*, 2002; MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Este índice é considerado baixo quando comparado à outras espécies bacterianas, como *Escherichia coli* (8,1%) e *Bacillus subtilis* (9%) (MADEIRA & GABRIEL, 2007).

Durante a evolução reductiva, pela qual estes organismos provavelmente passaram, vários mecanismos regulatórios presentes nas bactérias superiores foram perdidos (HALBEDEL *et al.*, 2007). Portanto, não possuem diversos genes codificando ortólogos bacterianos convencionais, tais como: múltiplos fatores sigma, sistemas de dois componentes (*two-component system*) e fator de terminação de transcrição Rho (FRASER *et al.*, 1995). Conseqüentemente, os sinais que promovem e regulam a transcrição nos micoplasmas provavelmente diferem significativamente de outras bactérias (WEINER III *et al.*, 2000).

Na maioria dos microrganismos, os mecanismos regulatórios podem ocorrer em diversas etapas da expressão gênica sendo, mais frequentemente, na etapa de início da transcrição. Diferentemente de arqueas e organismos eucarióticos, as bactérias apresentam somente um tipo de RNA polimerase. Entretanto, na maioria das espécies bacterianas são encontradas diversas subunidades sigma, gerando multiplicidade na atividade da RNA polimerase, permitindo assim, o reconhecimento de diferentes tipos de sequências promotoras. A utilização de diversos promotores pelo mecanismo de regulação por

subunidade sigma alternativa permite a expressão diferencial de genes dependendo das condições nutricionais ou ambientais (MADEIRA & GABRIEL, 2007). A análise dos genomas de micoplasmas demonstra a presença de uma única sequência codificadora para a subunidade sigma e um número mínimo de reguladores transcricionais (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Alguns estudos foram realizados, em *Mycoplasma pneumoniae*, objetivando analisar promotores e assim, gerar um melhor entendimento da transcrição. Nessa espécie foram identificadas *in silico* regiões envolvidas no início da transcrição, com similaridade à região -10 (TATA Box). Porém, a região -35 e mesmo o sítio RBS (Sítio de ligação do ribossomo) não se apresentaram claramente definidos (WEINER III *et al.*, 2000). Em estudo *in vivo*, realizado por HALBEDEL *et al.* (2007) em uma das regiões avaliadas por WEINER III *et al.* (2000), foi demonstrado que, realmente, a região -10 é importante para a transcrição, enquanto a região -35 não apresenta a mesma relevância.

Graças à disponibilidade de diversos genomas de micoplasmas anotados, a análise da expressão em nível transcricional tem sido uma ferramenta muito empregada na busca do entendimento da regulação da transcrição. Estudos importantes como o de MADSEN *et al.* (2006a) demonstraram um aumento na transcrição de nove genes e redução na transcrição de 18 outros como resposta de *M. hyopneumoniae* à condições de carência de ferro. A análise transcricional global de *M. hyopneumoniae* também foi realizada em condições de infecção, permitindo a identificação de 79 genes com alteração no padrão transcricional, sendo 33 deles com aumento nos níveis de transcrição (MADSEN *et al.*, 2008). Quando submetido a choque térmico, *M. hyopneumoniae* responde com o aumento na transcrição de 50 genes, enquanto outros 41 têm este nível reduzido (MADSEN *et al.*, 2006b). Apesar de todos os dados gerados, ainda não foi possível determinar os mecanismos utilizados por estes organismos para definição do início da transcrição, nem como ocorre a regulação da expressão gênica, permanecendo o questionamento sobre a adaptação dos micoplasmas às mudanças ambientais e como ocorre a manutenção da homeostase celular.

1.4. Unidades de transcrição

O termo operon foi introduzido, inicialmente, para definir um grupo de genes codificadores de produtos funcionalmente relacionados, regulados pelo mesmo operador e transcritos em um mRNA policistrônico (JACOB & MONOD, 1961). O termo unidade de transcrição é utilizado para descrever qualquer gene ou grupo de genes adjacentes que sejam transcritos a partir de um mesmo promotor, em um mRNA policistrônico e, coordenados também por um mesmo terminador (FONDI *et al.*, 2009). Atualmente, com a disponibilidade de dados de genomas e análises detalhadas da organização gênica, estes conceitos são cada vez, mais amplos. Definições de operon e unidade de transcrição são frequentemente confundidas, pois têm significados muito semelhantes. Neste estudo, será utilizado a definição de UT para se referir a duas ou mais ORFs transcritas em um mRNA policistrônico. A definição de operon é mais abrangente, pois considera as UTs juntamente com as sequências *upstream* e *downstream* regulatórias, ou seja, promotor e terminador.

De acordo com a definição original de JACOB & MONOD (1961), as ORFs serão transcritas em um mRNA policistrônico se estiverem fisicamente próximas e pertencentes à mesma via funcional, como forma de garantir níveis similares de expressão. Porém, análises mais detalhadas de genomas completos vêm modificando esta teoria. Primeiramente, pelo fato de muitos genes, sem aparentes relações funcionais, serem co-transcritos, dependendo de fatores ambientais (PRICE *et al.*, 2006; FONDI *et al.*, 2009). Outra característica é a presença de múltiplos promotores e/ou terminadores controlando diversas unidades de transcrição que, portanto, não estão estruturadas como a definição original (VICENTE *et al.*, 1998; PRICE *et al.*, 2006). Finalmente, as UTs exibem diferentes graus de compactação, apresentando normalmente, distância intergênica menor de 20 pb (EYRE-WALKER, 1995; MORENO-HAGELSIEB & COLLADO-VIDES, 2002) e, em alguns casos, ocorrendo sobreposição de genes (EYRE-WALKER, 1995). No entanto, extensos espaços intergênicos ocorrem com frequência, principalmente em UTs altamente expressas, podendo isso, estar relacionado à presença de promotores internos (PRICE *et al.*, 2006).

As UTs representam uma das principais estratégias de organização e regulação gênica. Em um genoma procariótico típico, aproximadamente 50% das sequências codificadoras estão organizadas em UTs (PRICE *et al.*, 2006). No entanto, análises

comparativas demonstram que esta organização pode ser pouco conservada, tendendo à reorganização dos genes dentro das UTs (MUSHEGIAN & KOONIN, 1996; ITOH *et al.*, 1999).

Embora genes na mesma UT tenham padrões de expressão semelhantes (SABATTI *et al.*, 2002), também pode ocorrer co-regulação de genes não co-transcritos (PRICE *et al.*, 2006). LAWRENCE & ROTH (1996) sugerem que a co-regulação pode evoluir mais facilmente pela modificação de dois promotores independentes do que pela aproximação de dois genes. Do mesmo modo, PRICE *et al.* (2005a) propõem que, para uma regulação complexa, uma UT com um promotor complexo surge mais rapidamente que dois promotores complexos independentes. Portanto, unidades transcricionais tendem a apresentar sequências regulatórias mais complexas e conservadas do que genes transcritos individualmente (ROGOZIN *et al.*, 2002; HAZKANI-COVO & GRAUR, 2005; PRICE *et al.*, 2005b). Genes envolvidos em diferentes vias metabólicas podem ser requeridos em uma mesma condição ambiental. Exemplo disso é a presença, em operons conservados, de genes para proteínas ribossomais e enzimas do metabolismo central entre os gêneros bacterianos, talvez porque ambos são requeridos em taxas proporcionais durante o crescimento do organismo (ROGOZIN *et al.*, 2002).

Como uma alternativa para a teoria da co-regulação da formação das unidades de transcrição, LAWRENCE & ROTH (1996) propõem a forma de operon *selfish* para um processo envolvendo a transferência horizontal de genes (HGT). Esta teoria é consistente com a compactação das UTs, e também com a observação de que operons frequentemente são submetidos à HGT (LAWRENCE & ROTH, 1996; OMELCHENKO *et al.*, 2003). No entanto, genes essenciais e outros não transferidos horizontalmente (não-HGT) são provavelmente, também pertencentes as UTs (PÁL & HURST, 2004; PRICE *et al.*, 2005a), e genes não-HGT formam um número significativo de novos operons (PRICE *et al.*, 2005a). Além disso, a teoria *selfish* não pode explicar a existência de muitas UTs que contêm genes funcionalmente não relacionados. Assim, parece que a HGT pode aumentar a prevalência de algumas unidades, mas ela não seria o maior fator na formação destas (PRICE *et al.*, 2006). Recentemente, PRICE *et al.* (2008) sugeriram que o modelo *selfish* não estaria relacionado à formação dos operons em geral.

O modelo operon *selfish* assume que a proximidade física de genes em uma unidade de transcrição não determina seleção benéfica aos organismos individualmente,

mas aumenta a aptidão do agrupamento de genes. Estes podem ser herdados, de maneira eficaz, tanto horizontalmente como verticalmente (LAWRENCE, 1999). A teoria assume também que genes essenciais são preferencialmente transcritos em mRNA monocistrônico. Ao aplicar estas hipóteses na análise do genoma de *E. coli* K12, PÁL & HURST (2004) contrariaram esta teoria. A partir de seus achados, os autores concluíram que genes essenciais, com funções relacionadas, apresentam forte tendência em se organizar em unidades. Sendo estes, particularmente abundantes neste modo de organização (PÁL & HURST, 2004).

Apesar do número de estudos sobre a estrutura, distribuição e conservação das UTs, o significado biológico, bem como os mecanismos de sua formação, permanecem sob intensas discussões entre pesquisadores da área. Modelos e teorias são propostos na tentativa de explicar a formação das UTs, porém todos apresentam consistências e inconsistências (FONDI *et al.*, 2009). Alguns deles geraram impacto e repercussão mais significativos na literatura e, portanto, serão detalhadamente descritos a seguir.

I) Modelo de molaridade: Esta teoria assume a afirmação de que a co-regulação garante que as proteínas sejam sintetizadas em quantidades equimolares, reduzindo as diferenças nos níveis de concentração (SWAIN, 2004), podendo aumentar as taxas de formação e dobramento de multisubunidades de complexos proteicos (PÁL & HURST, 2004). Porém, diferenças na eficiência da atividade de enzimas e no processo de tradução de uma mesma UT, além da meia-vida de diferentes mRNAs, podem reduzir a probabilidade da produção equimolar de proteínas. Mesmo que algumas UTs altamente conservadas codifiquem complexos proteicos, a maioria delas não codificam, sendo, portanto, muitos complexos proteicos não codificados por genes organizados em uma mesma UT (BUTLAND *et al.*, 2005).

II) Teoria do operon *selfish*: esta teoria afirma que a organização compacta facilitou a HGT de agrupamentos de genes não-essenciais, dos quais, as funções são ocasionalmente usadas e tendem a deleções aleatórias de genes, pela pressão de mutação e movimento genético. Este modelo é consistente com a compactação das UTs ou operons e com a ocorrência de transferência horizontal de UTs (LAWRENCE & ROTH, 1996; OMELCHENKO *et al.*, 2003; HAZKANI-COVO & GRAUR, 2005; PRICE *et al.*, 2005a). Porém, ele não explica a organização em UTs de genes com funções vitais, e, a justificativa para esta forma de organização conter também genes com funções não

relacionadas. Além disso, como anteriormente citado, genes essenciais e não-HGT são frequentemente encontrados em UTs (PÁL & HURST, 2004; PRICE *et al.*, 2005a). Assim, foi sugerido que a HGT atua na distribuição de algumas UTs ou na modificação de UTs já existentes (OMELCHENKO *et al.*, 2003). Portanto, a formação de UTs ou operons pode ser dirigida pelo agrupamento gênico, através de rearranjos e deleções, de modo a facilitar a co-regulação (PRICE *et al.*, 2005b; PRICE *et al.*, 2006).

III) Modelo *piece-wise*: descrita por FANI *et al.* (2005), esta teoria propõe uma nova explicação para a origem e evolução de algumas UTs ou operons. Considerando este modelo, longas e complexas UTs são construídas pelo progressivo agrupamento de subunidades pré-existentes, combinadas também com genes individuais. O modelo também indica que a construção de UTs compactas poderia ocorrer através de um progressivo agrupamento de subunidades de transcrição, que seriam um estágio intermediário, o qual poderia incluir sequências intergênicas, possivelmente contendo promotores. A teoria *piece-wise* é também consistente com a possibilidade de, em diferentes estágios da compactação das UTs, genes envolvidos em rotas metabólicas distintas, serem recrutados e especializados para se agruparem em uma única UT (FANI & FONDI, 2009; FONDI *et al.*, 2009).

1.5. Unidades de transcrição em *Mycoplasma* sp.

Estudos em *Mycoplasma* sp. ressaltam a presença de unidades de transcrição, porém, os trabalhos existentes são sempre focados em uma ou poucas UTs. Entretanto, são trabalhos importantes, pois apesar de raros, retratam a existência de co-regulação neste gênero bacteriano.

M. pneumoniae é a espécie que, até o momento, tem o maior acúmulo de dados sobre o assunto. Alguns exemplos podem ser citados, como a unidade de transcrição formada pelas ORFs MPN140, MPN141 e MPN142, que foi primeiramente sugerida por INAMINE *et al.* (1988), e recentemente, confirmada pela técnica de RT-PCR (WALDO & KRAUSE, 2006). Estudos nesta UT são de grande importância, uma vez que, MPN141 e MPN142 codificam o complexo de adesina P1, P40 e P90 e a MPN140 codifica uma fosfoesterase (WALDO & KRAUSE, 2006).

WALDO III *et al.* (1999) descreveram o agrupamento do gene *hmw* em *M. pneumoniae*, também codificadores de genes relacionados à citoaderência, sendo uma longa UT, representada por uma organização transcricional complexa de aproximadamente 13 Kb. A co-transcrição das ORFs foi demonstrada por RT-PCR e, com ensaios de *primer extension*, sendo possível determinar a presença de quatro promotores, formando também, transcritos internos nesta unidade. Resultados semelhantes foram sugeridos para *Mycoplasma genitalium*. Através de análises *in silico* do genoma desta espécie, foi observada a presença de transcritos longos gerando mRNA policistrônicos, com o início da transcrição ocorrendo, possivelmente, uma única vez em cada agrupamento gênico (HIMMELREICH *et al.*, 1997).

Na espécie *M. genitalium*, os genes relacionados à citoaderência parecem apresentar organização semelhante à encontrada em *M. pneumoniae* (MUSATOVOVA *et al.*, 2003). Como exemplo ressaltamos a organização semelhante da UT da adesina P140 de *M. genitalium*, homóloga à adesina P1, de *M. pneumoniae*. Ambas estão organizadas em UTs flanqueadas por duas outras ORFs, apresentando transcritos internos (MUSATOVOVA *et al.*, 2003). Desta forma, acredita-se que, nestas bactérias, a transcrição inicie no primeiro gene de um grande agrupamento e termine com baixa frequência, pois o término da transcrição não apresenta sequências definidas.

Genes codificadores de proteínas ribossomais estão agrupados em UTs na grande maioria das espécies bacterianas (FUJITA *et al.*, 1999). Similarmente, esta forma de organização também ocorre em *Mycoplasma* sp., porém, alguns agrupamentos destas proteínas diferem. Estas diferenças foram encontradas em *Mycoplasma gallisepticum*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* e *Bacillus subtilis*, espécie que compartilha ancestral comum com os micoplasmas (SKAMROV *et al.*, 2002). Portanto, esta diversidade de organização das proteínas ribossomais possivelmente, também ocorre em *M. hyopneumoniae*.

Até o momento existem poucos resultados demonstrando a presença de UTs em *M. hyopneumoniae*. ADAMS *et al.* (2005) demonstram que genes codificadores da adesina P97 e outra proteína paráloga a ela, P102, são transcritos num mRNA policistrônico. A partir de dados de predição de sequências *in silico*, MADEIRA & GABRIEL (2007) sugerem que *M. hyopneumoniae*, bem como as demais espécies de *Mycoplasma*, apresentam seus genomas extensivamente organizados em unidades transcricionais.

1.6. Unidades de transcrição: Estudos experimentais e *in silico*

A determinação de uma UT, primeiramente, é realizada pela demonstração da co-transcrição de ORFs que a compõem. Outra evidência associada à ocorrência de UTs são os sinais de controle da transcrição, ou seja, a presença de promotores e terminadores transcricionais. Portanto, a localização de um promotor, na região 5' do primeiro gene, e de um terminador, na região 3' do último gene, fornece informações relevantes na determinação de um conjunto de genes formadores de uma UT. A identificação das regiões regulatórias, no entanto, necessita de ferramentas moleculares tanto para a predição, quanto para a confirmação experimental (CRAVEN *et al.*, 2000). As estruturas das UTs podem ser muito variáveis, considerando a possibilidade de ocorrência de promotores e terminadores internos e os métodos de predição de UTs são deficientes quanto à capacidade de caracterizar estas estruturas regulatórias necessitando ainda, de aperfeiçoamentos (OKUDA *et al.*, 2007).

Muitos programas computacionais têm sido desenvolvidos para a análise e predição de UTs ou operons (CRAVEN *et al.*, 2000; SABATTI *et al.*, 2002; PRICE *et al.*, 2005b). Estes programas consideram, na predição das UTs, dados de expressão gênica (CRAVEN *et al.*, 2000) e co-ocorrência de categorias funcionais (ZHENG *et al.*, 2002). Além disso, muitos grupos têm predito UTs, através da abordagem de genômica comparativa (PRICE *et al.*, 2005b; WESTOVER *et al.*, 2005). Porém, as análises são, principalmente, validadas nas informações referentes ao genoma de *E. coli*, sendo que, poucos são os trabalhos desenvolvidos completamente para outros organismos. Entre os organismos também analisados, neste contexto, podemos ressaltar a espécie de *B. subtilis* onde foi utilizado o método de HOON e colaboradores (HOON *et al.*, 2003; HOON *et al.*, 2004a; HOON *et al.*, 2004b). A principal razão para a maioria dos estudos serem realizados em *E. coli* se deve ao fato desta bactéria ser o microrganismo melhor estudado e caracterizado. No entanto, estas predições não podem ser completamente aplicadas a outras espécies bacterianas (OKUDA *et al.*, 2007).

Os métodos de predição de UTs descritos na literatura são baseados na combinação de quatro critérios: distância intergênica, agrupamentos gênicos conservados, relação funcional, presença de sequências regulatórias (promotor, terminador e sítio de ligação de fatores da transcrição). A confirmação experimental é um passo essencial, após a predição.

(BROUWER *et al.*, 2008). Com o intuito de verificar a eficiência destes critérios nas predições computacionais e posterior confirmação experimental, BROUWER *et al.* (2008) compararam as predições realizadas para o genoma de *E. coli* e de *B. subtilis* concluindo que a observação da distância intergênica seria o critério mais confiável.

A predição de UTs *in silico* gera um número muito grande de dados, para as mais variadas espécies microbianas. Porém, a confirmação experimental destes dados se torna cada vez mais necessária, pois o valor da predição *in silico* é considerado relativo (BROUWER *et al.*, 2008), sendo, atualmente, discutível. Exemplos de ferramentas empregadas em ensaios experimentais, na demonstração de co-transcrição e ocorrência de UTs, são: RT-PCR, proteção por nuclease S1, *primer extension*, *northern blot*, qPCR, *microarray*.

Os experimentos de hibridização RNA/DNA e RNA/RNA (*northern blot*) apresentam boas vantagens, pois permitem demonstrar a presença de todas as unidades co-transcritas incluindo as longas UTs. No entanto, diversos trabalhos relatam o insucesso no emprego desta técnica (WALDO III *et al.*, 1999; AGUENA *et al.*, 2002; MUSATOVOVA *et al.*, 2003; HOON *et al.*, 2005), devido, principalmente, à instabilidade, degradação e processamento destas longas moléculas de mRNA. Estudos em diversos sistemas bacterianos demonstraram que o mRNA policistrônico sofre processamento pós-transcricional por clivagens endonucleolíticas (FAUBLADIER *et al.*, 1990; GAMPER & HAAS, 1993; NAURECKIENE & UHLIN, 1996). Portanto, a presença de pequenos transcritos (transcritos internos) pode ser resultado de clivagens por endonucleases específicas, e não um indicativo da ocorrência de promotores internos (AGUENA *et al.*, 2002).

Programas computacionais de predições de sequências promotoras têm sido baseados em dados disponíveis para *E. coli*, não apresentando boa aplicabilidade nas definições de promotores em *Mycoplasma* sp. (VALIATI, 2006). A adaptação da matrix de predição de promotor para o conteúdo G+C de micoplasmas também não gerou bons resultados, principalmente devido a pouca disponibilidade de sequências promotoras experimentalmente definidas. A análise de promotores de micoplasma em *E. coli* também apresenta desvantagens, pois o alto conteúdo A+T no genoma daqueles, resulta em sequências aleatórias capazes de realizar a ativação da transcrição neste sistema heterólogo (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 1998).

A predição *in silico* de terminadores em micoplasmas é bastante restrita principalmente devido ao elevado conteúdo A+T no genoma destas bactérias e a provável existência de mecanismos de transcrição adversos à maioria dos procariotos. Análises de terminadores da transcrição baseados no cálculo de energia livre em torno dos códons de terminação demonstraram que a definição de terminador da transcrição foi evidente quando aplicada no genoma de *E. coli*, mas não para outros genomas, como o de arqueas e *Mycoplasma* (WASHIO *et al.*, 1998). Assim, para *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, os autores sugerem que não ocorre a formação de estruturas de terminadores Rho-independente (grampo de terminação), concluindo que, este tipo de terminador parece não ser utilizado nestes microrganismos (WASHIO *et al.*, 1998). Em contrapartida, HOON *et al.* (2005), aplicando cálculos de estruturas secundárias e energia livre, propõem que a terminação Rho-independente representa a principal forma de terminação da transcrição em *Mollicutes*. WALDO III *et al.* (1999) analisando a transcrição do gene *hmw*, de *M. pneumoniae*, confirmaram, pela técnica de RT-PCR, a função dos grampos de terminação preditos que flanqueiam a UT do gene *hmw*. Por fim, concluímos que existem poucas evidências confirmando qualquer uma das teorias, não descartando ainda, a possibilidade da existência de outros modos de terminação da transcrição em micoplasmas.

Devido às peculiaridades nos genomas de micoplasmas, estudos de predição de UTs, ou mesmo de sequências promotoras e terminadoras, empregando os programas computacionais e bancos de dados disponíveis, são particularmente difíceis de serem realizados. Até o momento, não existe um claro entendimento de como ocorre a regulação da expressão gênica em *Mycoplasma sp.*, bem como, de que maneira a transcrição gênica tem início nestas bactérias. Portanto, são necessárias informações sobre a organização gênica em genomas de espécies de micoplasmas, pois o entendimento da estrutura organizacional dos genomas permitirá a melhor compreensão dos mecanismos de regulação e das funções gênicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo caracterizar a distribuição e organização gênica em *M. hyopneumoniae* através da predição *in silico* e determinação experimental de unidades de transcrição.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a predição *in silico* das unidades de transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae*;
- Determinar experimentalmente a organização dos genes através da demonstração de suas unidades de transcrição;
- Correlacionar os dados *in silico* e experimentais com as análises genômicas dos diferentes isolados de *M. hyopneumoniae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise *in silico* das unidades de transcrição

Para a predição das UTs presentes no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, foi utilizada, como base de dados, a anotação depositada no *GenBank* (NC_007332). Com o uso do *software Artemis Release 10.5.2* (RUTHERFORD *et al.*, 2000) foi realizada a identificação manual de todas as UTs. Inicialmente, foram consideradas como pertencentes a uma UT as ORFs que apresentassem uma região intergênica ≤ 100 pb de separação entre elas.

3.2. Cultivo de *M. hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae 7448, procedente da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), foi isolado de um suíno infectado em Lindóia do Sul, SC, Brasil. O cultivo foi realizado em meio Friis líquido (FRIIS, 1975), modificado segundo B. Bittencourt (manuscrito em preparação), incubado a 37°C, sob agitação por 48 horas. Nestas condições, o número de células de micoplasma presentes equivale a aproximadamente 10⁸ UFC/ml.

3.3. Isolamento de DNA e RNA

O DNA genômico de *M. hyopneumoniae*, cepa 7448, foi extraído a partir de 5 ml de cultivo conforme protocolo em anexo (Anexo A).

O RNA total desta cepa de *M. hyopneumoniae* foi isolado de culturas de 20 ml de meio utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as descrições do fabricante, sendo ressuspenso em 20 µl de água RNase-free (DEPC). A preparação de RNA total foi tratada com 1 U/µg DNase/RNase free (Promega) a 37°C por 30 minutos e posteriormente quantificada em sistema Qubit™ (Invitrogen). A integridade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (Anexo B) e posteriormente, o RNA foi armazenado a -70°C.

3.4. Construção dos *primers*

Os *primers* (Apêndice A) foram projetados no programa *Vector NTI Advance 10* (Invitrogen), a partir da sequência nucleotídica da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae* (número de acesso no *GenBank*: NC_007332). Para análise dos mRNAs policistrônicos os pares de *primers* foram localizados entre a região 3' de uma ORF e a região 5' da ORF adjacente. A Figura 3.1 ilustra a distribuição dos pares de *primers* de uma UT predita *in silico*, sendo esta, composta por cinco ORFs. No total foram projetos e empregados nas análises 68 pares de *primers* (Apêndice A).

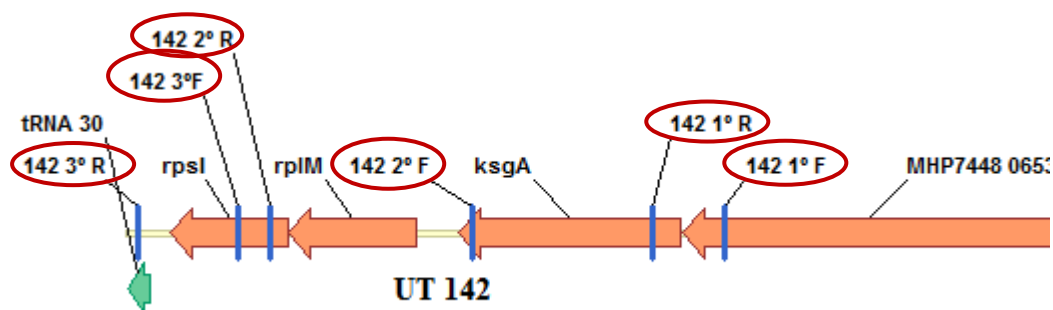


Figura 3.1: Unidade de transcrição em *M. hyopneumoniae*. Esquema ilustrando a localização de *primers* entre cinco ORFs, que formam uma UT de 3,14 Kb. As ORFs estão representadas pelas setas coloridas e a nomenclatura de cada uma delas segue a referência do *GenBank*. Foram projetados três pares de *primers* específicos. 142 1°F / 142 1°R, 142 2°F / 142 2°R e 142 3°F / 142 3°R, cujos produtos de amplificação são de 263 pb, 706 pb e 357 pb, respectivamente.

3.5. Amplificação de mRNA policistrônico

3.5.1. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada em uma reação com volume final de 12 µl, contendo 1 µg de RNA total, 132,5 ng de pd(N)₆ *random hexamer* (GE Healthcare) e 1 µl da mistura de dNTPs (10 mM) sendo incubada a 65°C por 5 minutos e rapidamente transferida para o gelo. Posteriormente, foi adicionada à reação 4 µl de 5X Tampão de reação (250 mM Tris-HCl - pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl de DTT 0,1 M e 1 µl de RNaseOUT (Inibidor de Ribonucleases recombinantes – 40 U/µl) e novamente incubada a 37°C por 2 minutos. Após adição de 1 µl (200 U) da enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (Invitrogen) a reação foi

incubada a, inicialmente 25°C por 10 minutos e posteriormente, a 37°C por 50 minutos, sendo então, inativada a 70°C por 15 minutos. Como controle da qualidade do RNA total, uma reação contendo os mesmos componentes exceto a enzima M-MLV RT foi realizada concomitantemente. O cDNA gerado, armazenado a -20°C, foi utilizado como molde nas reações de PCR.

3.5.2. Amplificação do cDNA por PCR

As reações foram preparadas utilizando, 16,5 µl de água ultrapura, 2,5 µl de tampão de enzima 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 500 mM KC), 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de dNTP (1 mM), 1 µl de cada *primer* (10 pmoles) (Apêndice A), 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase (5 U/µl) (Cenbiot Enzimas) e 1 µl de molécula molde, totalizando 25 µl de reação de PCR. Para cada par de *primers* foram realizadas quatro reações (Tabela 3.1). As condições de amplificação variaram para cada reação (Tabela 3.2), de acordo com a T_m dos *primers*, bem como com o tamanho esperado para o produto (Apêndice A), sendo realizadas no termociclador Endurance TC-412 (Analítica).

Tabela 3.1: Descrição dos moldes usados nas reações para cada par de *primers*.

	Molde	Objetivo
RT-PCR +	cDNA	Confirmar a ocorrência de co-transcrição.
RT-PCR -	cDNA sem adição de M-MLV RT	Controle da qualidade do RNA.
PCR +	DNA genômico de <i>M. hyopneumoniae</i>	Controle positivo da amplificação e qualidade dos <i>primers</i> e reagentes.
PCR -	Água ultrapura	Controle da reação de PCR.

Tabela 3.2: Condições gerais de amplificação das reações de PCR.

Desnaturação inicial	94°C por 5'
30 ciclos	94°C por 30''
	Tm variável por 30''
Extensão final	72°C por tempo variável
	72°C por 10'

Os fragmentos gerados nas reações de amplificação foram precipitados com RNA transportador (tRNA - Invitrogen). Para tanto, 1 µg de tRNA e 2,5 volumes de etanol absoluto (4°C) foram adicionados a cada reação de PCR e incubados a -20°C por 16 horas. Após centrifugação por 30 minutos e lavagem com etanol 70%, os DNAs foram ressuspensos em 25 µl de água ultrapura e armazenados a -20°C até a realização do sequenciamento.

Para a amplificação de produtos longos (tamanhos superiores a 1 kb) foi utilizada a metodologia de síntese de cDNA com o *Kit SMARTTM cDNA Library Construction* (Clontech) com modificações. Os cDNAs foram sintetizados utilizando o *primer* (5' PCR *primer*) do kit *SMART* juntamente com os *primers* específicos de cada unidade de transcrição. Na Figura 3.1, o *primer* 142 3°R da UT 142 é um exemplo de *primer* usado na reação de síntese de todo transcrito (3,14 Kb).

As reações de amplificação de transcritos longos (LD PCRs) foram realizadas em volume final de 50 µl contendo: 1X de tampão de reação (*High Fidelity PCR buffer*) com 15 mM MgCl₂, 2 mM de mistura de dNTP, 10 pmoles de *primer* reverso específico e 10 pmoles de 5' PCR *primer* (fornecido pelo Kit), 2,5 U de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas) e água DEPC. As condições de amplificação seguiram parâmetros estabelecidos pelo fornecedor da enzima, com temperatura de anelamento de 50°C e extensão de 7 minutos.

Os produtos gerados foram purificados utilizando o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram tratados com T₄ DNA polimerase (Fermentas) e com cinase de polinucleotídeos (*Polynucleotide kinase*, PNK, Fermentas) e clonados em vetor pUC18 clivado com *SmaI* e defosforilado com fosfatase alcalina de camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP, USB). As clonagens, eletrotransformações e extração do DNA

plasmidial foram realizadas de acordo com SAMBROOK & RUSSELL (2001), sendo estes plasmídios, posteriormente sequenciados.

3.5.3. Sequenciamento automático e análise dos dados

Os fragmentos amplificados e purificados por tRNA foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o *Kit Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), no sequenciador automático MEGABACE 1000, conforme manual do fabricante. Para a confirmação das sequências de nucleotídeos das diferentes ORFs, cada produto de amplificação foi sequenciado em duplicata, utilizando os *primers* específicos (Apêndice A).

Os resultados do sequenciamento foram processados utilizando o pacote de programas *Staden* (STADEN *et al.*, 2003), sendo analisados no banco de dados a partir do algoritmo *Blastn* do programa BLAST/NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4. RESULTADOS

4.1. Análise *in silico* das unidades de transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae*

A predição *in silico* das UTs teve como base a localização manual de regiões intergênicas (RI) com distâncias ≤ 100 pb (Figura 4.1). Foram localizadas 162 possíveis UTs representando aproximadamente 70% das ORFs do genoma. A Figura 4.1 apresenta uma região do genoma de aproximadamente 22 Kb contendo três diferentes unidades de transcrição UT1, UT2 e UT162. As UT1 e UT2 estão separadas por uma região intergenérica de 160 pb. As ORFs representadas por setas brancas estão separadas das UTs por regiões intergênicas superiores a 100 pb e foram portanto, consideradas transcritos independentes.

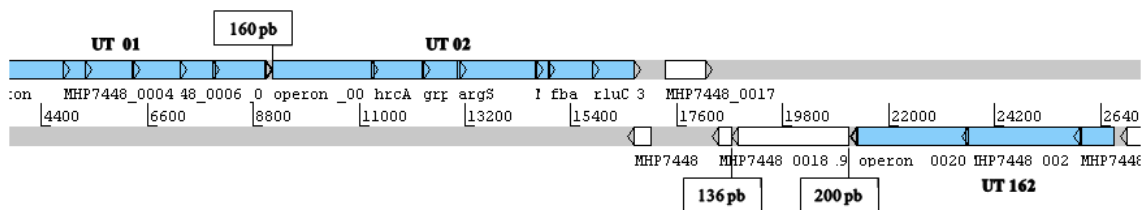


Figura 4.1: Predição *in silico* das unidades de transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae*. Na figura é apresentada uma região do genoma (posição 4854 a 26660) contendo três unidades de transcrição representadas pelas setas azuis. As setas brancas representam transcritos individuais. UT 01 é composta por seis ORFs, localizada no genoma entre 3010 – 9025 pb, com tamanho de 6,01 Kb; UT 02 é composta por sete ORFs, localizada entre 9192 – 16680 pb no genoma, com tamanho de 7,48 Kb; UT 162 é composta por três ORFs, localizada no genoma entre 21337 – 26642, com tamanho de 5,3 Kb. Nas caixas em destaque são demonstradas as distâncias intergênicas (superiores a 100 pb) que definiram a separação entre unidades transcripcionais. Visualizado no *software* Artemis.

A análise, *in silico*, das UTs demonstrou que estas apresentam tamanho variado sendo, em geral, longas e podendo conter de duas até 15 ORFs. A distribuição das ORFs em cada UT também apresenta diversidade de função dos seus produtos e, normalmente, pelo menos uma das ORFs contém um produto de função não-relacionada aos demais.

4.2. Análise experimental das unidades de transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae*

A definição experimental das unidades de transcrição foi realizada pela RT-PCR, através da amplificação dos fragmentos a partir de transcritos isolados de *M. hyopneumoniae*. A síntese dos *primers* e sua localização no genoma foi baseada nos dados de predição *in silico* das UTs. A Figura 4.2 representa um exemplo da metodologia utilizada para a localização dos *primers* e a análise dos produtos amplificados. Esta unidade, UT 30, contém dois genes, *rplU* e *rpmA*, relacionados à síntese de proteínas ribossomais (Figura 4.2 A), separados por uma região intergênica de 9 pb. Os *primers* foram localizados a uma distância de 487 pb possibilitando a confirmação da UT, da qualidade da reação de RT-PCR e da sequência de nucleotídeos da região selecionada. A Figura 4.2 B representa a análise realizada dos produtos gerados após a amplificação. A amplificação da região de 487 pb (Figura 4.2 B, canaleta 1), analisada por determinação da sequência de nucleotídeos, confirma que estes dois genes constituem uma UT. Com a utilização desta metodologia de RT-PCR foram caracterizadas 21 UTs, constituídas por um total de 130 ORFs no genoma de *M. hyopneumoniae*. No Apêndice B são apresentadas as principais características, destas 21 UTs experimentalmente confirmadas, como as ORFs que compõem cada UT, os produtos codificados por estas ORFs, sua posição no genoma, distância intergênica entre ORFs co-transcritas e, por fim, tamanho das UTs .

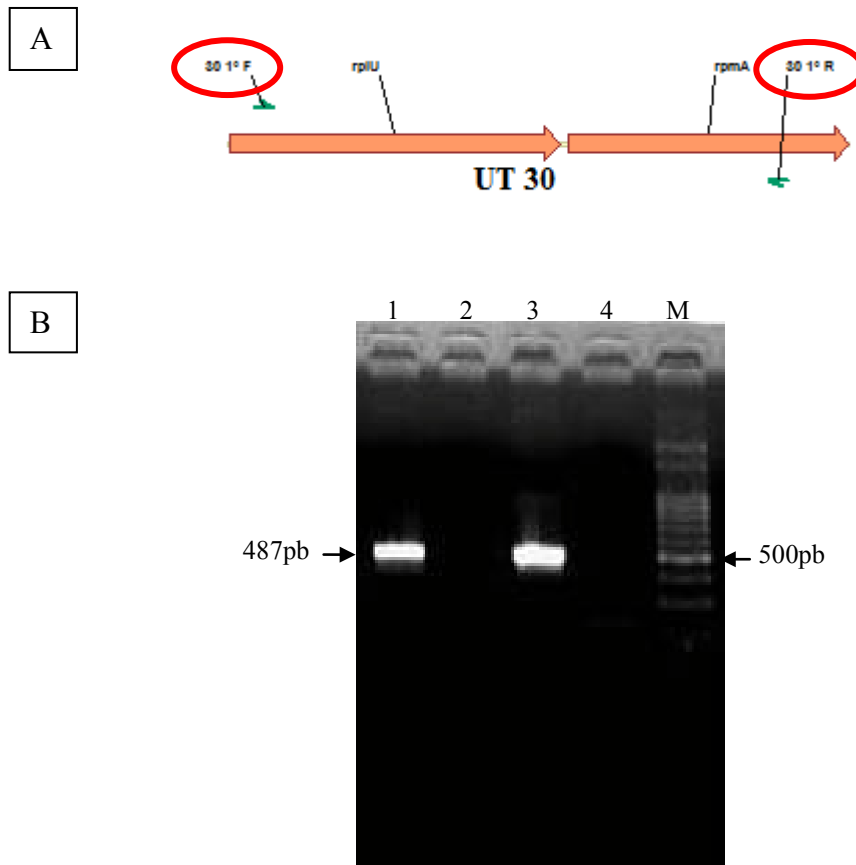


Figura 4.2: Modelo da confirmação experimental das unidades de transcrição de *M. hyopneumoniae*.

A: UT 30 contendo duas ORFs separadas por RI de 9 pb. A localização dos *primers* está demonstrada pelas setas verdes e possibilita a amplificação das ORFs e da RI entre elas. As ORFs estão representadas pelas setas coloridas e a nomenclatura de cada uma delas segue a referência do *GenBank*.

B: Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. Os produtos da amplificação visualizados nas canaletas 1 e 3 representam os resultados das reações de RT-PCR e PCR, respectivamente. A canaletas 2 contém a reação de RT-PCR sem a adição da enzima M-MLV RT e a canaletas 4 contém o controle negativo da reação de PCR. M representa o marcador de peso molecular (Ladder 100 pb - Ludwig Biotec). As setas indicam o tamanho do produto de 487 pb, e a banda de 500 pb do marcador de peso molecular.

Apartir da análise do Apêndice B, o qual traz informações sobre as 21 UTs confirmadas experimentalmente, é possível observar o padrão de organização das UTs no genoma de *M. hyopneumoniae*. O número de ORFs que constitui estas UTs é bastante variado, podendo ser de duas ORFs, como no caso da UT 92, ou 12 ORFs na UT 15. O tamanho destas UTs também é variado, e não depende necessariamente, do número de ORFs. A UT 92, por exemplo, é formada por apenas duas ORFs, mas tem extensão de 4.921 pb, enquanto a UT 78 que é constituída por cinco ORFs apresenta um tamanho de 3.147 pb. Outro fato interessante a ser destacado é a distância das RIs entre as ORFs,

ocorrendo uma variabilidade que vai desde a sobreposição de bases nucleotídicas, como entre as ORFs MHP7448_0263 e MHP7448_0264, na UT 15, onde há sobreposição de 27 pb, até longas distâncias intergênicas, de 484 pb, entre as duas ORFs da UT 92, ou ainda, 2.757 pb entre os genes *nrdF* e *glyA* da UT 10.

As UTs de *M. hyopneumoniae* são constituídas, em sua maioria, por ORFs cujos produtos não são funcionalmente relacionados (Apêndice B). Em alguns casos, é possível observar relação entre a organização das UTs e as funções dos produtos gênicos, como por exemplo a UT 92 cujos genes são codificadores das subunidades ribossomais 23S e 16S. No genoma desta bactéria muitas das ORFs codificam proteínas com função ainda não caracterizada, proteínas hipotéticas, dificultando as análises comparativas entre organização e função gênica. A UT 10 é um exemplo de unidade transcricional longa com 9.527 pb de extensão, contendo RIs longas, uma delas de 711 pb e outra de 2.757 pb. Alguns produtos codificados por genes pertencentes a esta UT, em especial os separados pela RI de aproximadamente 2,75 Kb, não possuem funções relacionadas, enquanto outros, como os codificados pelos genes *nrdE*, *nrdI* e *nrdF* apresentam funções relacionadas.

A partir dos primeiros resultados *in silico*, os quais inferiram a ocorrência de UTs no genoma de *M. hyopneumoniae* com tamanhos muito variáveis, com RIs superiores à 100 pb, foi realizada uma nova análise *in silico*, com o objetivo de avaliar o tamanho máximo da RI necessário para a definição de uma UT. Com o objetivo de validar esta nova procura *in silico*, que foi realizada em toda a extensão do genoma de *M. hyopneumoniae* (Figura 4.3 A), foram analisadas experimentalmente três regiões específicas (Figura 4.3 B, C e D). A hipótese levantada de que, mesmo em grandes RIs ocorreria a co-transcrição, foi evidenciada pela realização de RT-PCRs com *primers* específicos, em regiões como a ilustrada na Figura 4.3 C, onde ocorre uma ORF distante 2,7 Kb à orientação 5' de uma UT e na orientação 3' desta mesma UT, uma outra ORF distante 711 pb. Nestes experimentos, foi confirmada a ocorrência de co-transcrição nestas ORFs distantes dentro do genoma. Nos casos em que há grandes RIs, porém com uma ORF na orientação oposta a duas UTs, estas têm sua transcrição interrompida, sendo a ORF opositora transcrita como mRNA monocistrônico (Figura 4.3 D).

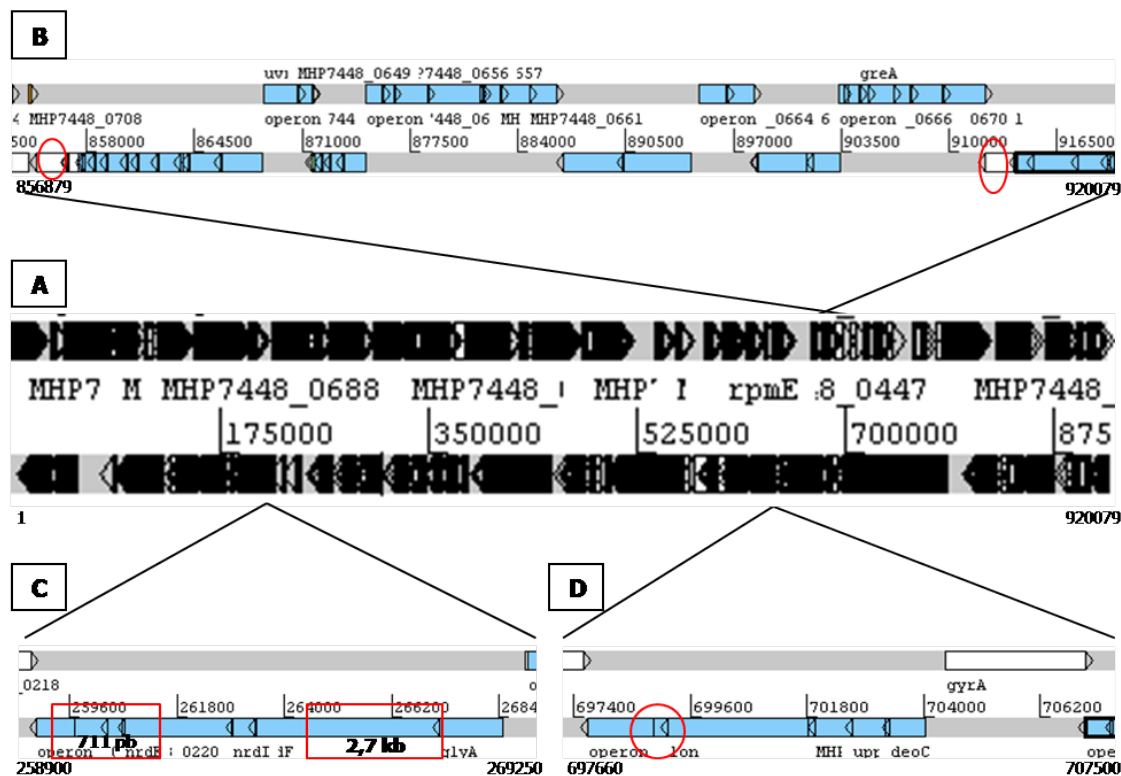


Figura 4.3: Representação global das unidades de transcrição no genoma de *M. hyopneumoniae*. As setas marcadas em azul representam as UTs, as marcadas em branco são as ORFs não co-transcritas e as regiões em cinza representam as RIs. **A:** Visualização das UTs do genoma completo de *M. hyopneumoniae* (920 Kb). Ampliadas estão exemplos de regiões analisadas experimentalmente. **B:** Região de 63,2 Kb, mostrando a organização das UTs no genoma de *M. hyopneumoniae*. São apresentadas nove UTs. Circuladas em vermelho, estão duas transposases. **C:** Região de 10,3 Kb do genoma. São destacadas em caixa alta duas RIs internas desta UT, de 711 pb e 2,7 Kb, onde foi demonstrada, por RT-PCR, que as ORFs adjacentes são co-transcritas. **D:** Região de 8,5 Kb do genoma. Duas UTs são interrompidas por uma ORF na fita oposta. Destacada em vermelho a RI (299 pb) entre ORFs lon e tuf, componentes da UT 57, onde foi encontrado um promotor interno para o tuf (sub-operons). Os números representam as posições no genoma e a nomenclatura de alguns genes está presente. Visualização no *software* Artemis.

A região do genoma representada na Figura 4.3 B, corresponde a aproximadamente 63,2 kb, apresentando nove unidades de transcrição, comprovadas experimentalmente através de RT-PCR e sequenciamento, compostas por 44 ORFs, além da presença de duas transposases, as quais estão circuladas em vermelho na figura, sendo ambas localizadas a distâncias inferiores a 200 pb das UTs adjacentes. Esta região ilustra o modo como o genoma de *M. hyopneumoniae* é organizado, uma vez que, é claramente visualizada a distribuição das UTs, nas duas fitas de DNA. O número de ORFs que constitui cada UT é variável (Apêndice B), podendo ser duas ORFs, como mostrado na Figura 4.3 B para quatro das UTs demonstradas, até várias ORFs, como mostrado nas outras cinco UTs da figura. Similarmente aos exemplos do Apêndice B, os produtos

codificados pelas ORFs pertencentes as UTs representadas na Figura 4.3 B não apresentam, necessariamente, funções relacionadas.

A determinação das UTs de *M. hyopneumoniae* através da análise *in silico* (Figura 4.3 A) e da caracterização dos produtos amplificados (Figura 4.3 B, C e D) confirma que nesta bactéria a organização dos genes pode ocorrer em longos transcritos, mesmo tendo grandes RIs. As UTs estão distribuídas entre as duas fitas de DNA, sendo o início e o término da síntese do transcrito localizados de modo a propiciar uma alternância na utilização da fita do DNA. Estes resultados foram confirmados através da análise da região contendo o gene que codifica uma subunidade da DNA girase (*gyrA*). O gene *gyrA* é transcrito isoladamente, estando localizado a uma distância de 9.235 pb e 6.841 pb de UTs transcritas na mesma orientação (não mostrado na figura). Na fita oposta à do gene *gyrA* estão presentes duas UTs (UT 56 e UT 57) confirmadas experimentalmente (Figura 4.3 D). A UT 57 contém cinco ORFs e a UT 56 sete, a qual é representada na Figura 4.3 D somente pela porção final de sua última ORF. Com o objetivo de verificar a presença de mRNA policistrônico entre as ORFs pertencentes as UT 56 e UT 57 foram localizados pares de *primers* na região intergênica entre estas UTs (Apêndice A). Os resultados demonstraram a ocorrência de transcritos independentes nas duas UTs, confirmando que, quando existe uma ORF na orientação oposta à duas UTs, estas têm sua transcrição interrompida, sendo a ORF opositora transcrita como mRNA monocistrônico (Figura 4.3 D).

Na região ilustrada na Figura 4.3 D, entre os genes *Ion* e *tuf*, os quais estão separados por uma RI de 299 pb (destacada na imagem) e são pertencentes à UT 57, foi encontrado um promotor interno, pela técnica de *primer extension* (S.S. Weber, comunicação pessoal). Estes resultados evidenciam a existência de elementos regulatórios internos nas UTs, determinando a ocorrência de subunidades, que são determinantes na transcrição diferencial de algumas ORFs pertencentes às UTs.

Nos experimentos realizados, as maiores ampliações, pela técnica de RT-PCR, foram de aproximadamente 2 Kb. A demonstração de uma UT completa, ou seja, a amplificação do transcrito desde sua região 5' até a região 3', é inviável devido aos limites da metodologia. Objetivando demonstrar a presença do transcrito completo foi utilizada a metodologia de síntese de cDNA com o *Kit SMARTTM*. Porém, não se obteve resultados satisfatórios, e isso pode ser devido à instabilidade de grandes moléculas de mRNA.

A Figura 4.4 demonstra a variabilidade no tamanho das regiões intergênicas, dentro das UTs confirmadas experimentalmente, sendo possível observar que a grande maioria possui distâncias variando entre 0 a 50 pb. Isso pode ser justificado pelo fato do genoma de *M. hyopneumoniae* ser extremamente reduzido. No entanto, muitas regiões intergênicas apresentam um tamanho superior a 100 pb. Em vista disso, a partir das análises *in silico* e confirmações experimentais foram consideradas como pertencentes a uma mesma UT as ORFs posicionadas numa mesma orientação, sendo apenas interrompidas pela presença de uma ORF ou UT na orientação oposta (Figura 4.3 B).

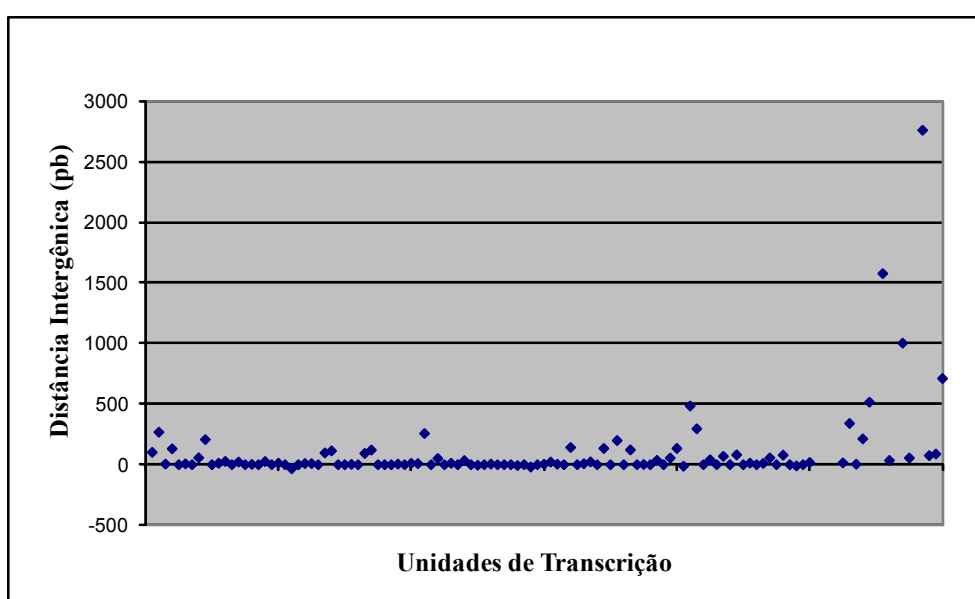


Figura 4.4: Regiões intergênicas das unidades de transcrição analisadas em *M. hyopneumoniae*. O gráfico representa as distâncias intergênicas dentro das 21 UTs evidenciadas experimentalmente. Cada ponto em azul é referente a uma RI nas UTs. Apesar da grande maioria das RIs terem distâncias próximas a 50 pb, algumas RIs chegam a mais de 2,5 Kb.

Com os resultados apresentados, conclui-se que as ORFs presentes no genoma de *M. hyopneumoniae* estão organizadas em 112 UTs, sendo que, 21 delas foram confirmadas experimentalmente, com o emprego de RT-PCR (Apêndice B). Estas 21 UTs são compostas por 130 ORFs, apresentam uma variação de tamanho entre 500 pb a 11 Kb, representando 147 kb de extensão e correspondem a 16% do total do genoma. Um alinhamento múltiplo das regiões 5' e 3' das 21 UTs validadas foi realizado no *software* ClustalW2. No entanto, não foi observada nenhuma similaridade entre estas regiões ou aparentes motivos que pudessem estar relacionados ao início ou término da transcrição gênica destas UTs.

Considerando que o genoma desta espécie de micoplasma contém um número total de 709 regiões codificantes, somente 41 sequências codificadoras são transcritas em mRNA monocistrônico. Analisando os produtos destas ORFs (Apêndice C), bem como a sua localização no genoma, não foi possível estabelecer uma correlação funcional entre elas ou uma justificativa, a partir dos dados conhecidos até o momento, para serem transcritas de maneira independente. Dentre estas ORFs com transcrição independente, 19 são caracterizadas como produtos hipotéticos, outras 19 codificam diversas proteínas, caracterizadas como proteínas de superfície, de transporte celular, chaperonas, entre outras. Ainda, há três genes tRNAs (aminoácidos serina, leucina e triptofano). Enquanto a subunidade A da DNA girase é codificada num mRNA monocistrônico (Apêndice C), a ORF codificadora da subunidade B, posicionada entre os nucleotídeos 148967 a 150886 no genoma de *M. hyopneumoniae*, faz parte de uma UT, aproximadamente 553 Kb distante da ORF codificadora da subunidade A, cujos produtos são as adesinas P102 e P97, proteínas de função hipotética, fosfofrutoquinase-6, tRNA-lisina, além de uma transposase.

A região do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 ilustrada na Figura 4.3 B, correspondente a 63,2 kb, contendo 44 ORFs organizadas em nove UTs, foi comparada com as regiões equivalentes no genoma de outros dois isolados: cepa J – não patogênica (VASCONCELOS *et al.*, 2005) e cepa 232 - patogênica (MINION *et al.*, 2004). É possível observar conservação, quase que absoluta, quanto a organização, distribuição e ocorrência de ORFs pertencentes as UTs, entre os genomas das três cepas de *M. hyopneumoniae* (Figura 4.5). Quanto à ocorrência de UTs, nesta região apresentada, os três genomas contêm nove UTs sendo que, nos genomas das cepas 7448 e J, a organização é praticamente idêntica, somente diferindo pela presença de duas transposases, na cepa 7448, as quais estão circuladas em vermelho na Figura 4.5. Já no genoma da cepa 232 existe uma pequena variação, sendo observada a existência de ORFs individuais, também destacadas na Figura 4.5. Porém, estas ORFs são, nas outras duas linhagens, pertencentes à UTs. A partir de uma análise mais cuidadosa, foi observado que estas ORFs, aparentemente individuais, estão completamente sobrepostas sobre as UTs na fita oposta. Portanto, podemos sugerir que esta variação na organização da cepa 232 trata-se de artefato de anotação do genoma.

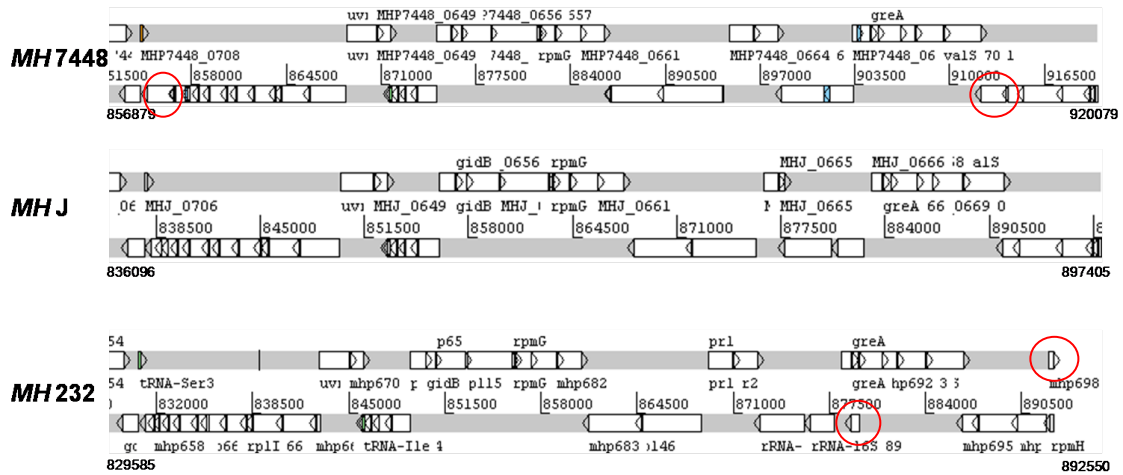


Figura 4.5: Distribuição das unidades de transcrição em três diferentes genomas de *M. hyopneumoniae*. A região representada corresponde a figura 4.3 B de *M. hyopneumoniae* cepa 7448 (MH 7448). MH J corresponde a região do genoma da cepa J e MH 232 da cepa 232 de *M. hyopneumoniae*. Esta última região apresenta uma organização diferenciada, pela presença de ORFs individuais e sobrepostas à ORFs na fita oposta, estando destacadas em vermelho. Duas transposases, no genoma da cepa 7448 são circuladas em vermelho. As posições do genoma estão representadas pelos números localizados a esquerda e a direita abaixo de cada figura. (MH 7448 - acesso: NC_007332, MH J - acesso: NC_007295 e MH 232 - acesso: NC_006360). Visualização no *software* Artemis.

5. DISCUSSÃO

O entendimento da estrutura organizacional de genomas bacterianos é de fundamental importância, principalmente com o número crescente de informações que estão sendo atualmente geradas através dos projetos de sequenciamento de genomas. As bactérias apresentam genomas extremamente organizados, sendo encontrados elementos estruturais e funcionais. Estes elementos podem incluir promotores, terminadores, sítio de início de transcrição (TSS), ORF, regiões regulatórias não codificadoras, regiões não traduzidas e UTs (CHO *et al.*, 2009). Apesar de todas as informações e tecnologias disponíveis, o estabelecimento da estrutura organizacional dos genomas é, ainda assim, uma tarefa desafiadora. Este trabalho teve como objetivo determinar a organização das UTs no genoma de *M. hyopneumoniae*, dando subsídios ao entendimento da regulação da transcrição nesta bactéria.

Análises detalhadas de transcriptomas e proteomas, de diversos procariotos, indicam que as informações contidas e a estrutura de um genoma são muito mais complexas do que previamente se imaginava (CHO *et al.*, 2008a; MEDINI *et al.*, 2008). Estudos e tecnologias, que concretizarão o entendimento das funções dos componentes celulares na transcrição e tradução em escala genômica, estão apenas em fase inicial (GRAINGER *et al.*, 2005; FAITH *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2008b; ISHIHAMA *et al.*, 2008; TYPAS *et al.*, 2008; FEIST *et al.*, 2009).

As UTs de *M. hyopneumoniae*, demonstradas experimentalmente neste trabalho, são compostas, em geral, por ORFs codificadoras de produtos não relacionados funcionalmente (Apêndice B). A afirmação de que, as UTs possuem regiões regulatórias muito mais complexas que genes transcritos individualmente (PRICE *et al.*, 2005b; HAZKANI-COVO & GRAUR, 2005), pode representar uma justificativa da presença de muitas UTs no genoma de *M. hyopneumoniae* com genes sem relação funcional. Estes produtos podem ser requeridos em uma mesma condição ambiental, apesar de estarem envolvidos em diferentes rotas metabólicas (PRICE *et al.*, 2006), e desta maneira, se agruparem em unidades transcricionais.

A ORF *tuf*, co-transcrita em mRNA policistrônico, na UT 57 de *M. hyopneumoniae*, está localizada a 299 pb de distância de outra ORF adjacente (Apêndice B). Em experimentos de *primer extension*, objetivando o mapeamento dos sítios de início da transcrição, foi verificada a presença de uma sequência promotora interna (S. S. Weber,

comunicação pessoal), gerando um transcrito monocistrônico. O produto codificado pelo gene *tuf* é o fator de alongação EF-Tu, necessário para os processos de síntese de proteínas, que estão sempre funcionais em células metabolicamente ativas. Este caso representa, possivelmente, um exemplo de regulação complexa, com a ocorrência de transcritos alternativos, onde o gene *tuf* tem sua transcrição não apenas regulada pelos elementos regulatórios da UT a qual ele pertence, mas também, regulado por elementos localizados no seu próprio promotor. Estes achados evidenciam a existência de elementos regulatórios internos nas UTs de *M. hyopneumoniae*, determinando a presença de subunidades, que são importantes na transcrição diferencial de algumas ORFs pertencentes as UTs. Outros autores (PRICE *et al.*, 2006) também concluíram que a ocorrência de grandes distâncias intergênicas é frequente em unidades altamente expressas, estando isso relacionado à presença de promotores internos. Trabalhos de OKUDA *et al.* (2007) demonstraram que a presença de elementos regulatórios internos em UTs é extremamente dependente do tamanho das regiões intergênicas, sendo estes, responsáveis pela determinação do tamanho da unidade transcricional, assim como, das subunidades.

Com as análises *in silico* e confirmações experimentais, é possível afirmar que a grande maioria das UTs no genoma de *M. hyopneumoniae* possui distâncias intergênicas variando entre 0 a 50 pb (Figura 4.4). Genes co-transcritos em UTs tendem a manter agrupamentos mais compactos no genoma, sugerindo que pequenas regiões intergênicas possam facilitar uma transcrição mais eficiente (OKUDA *et al.*, 2007). Devido ao fato do genoma de *M. hyopneumoniae* ser extremamente reduzido, já é esperada uma maior compactação gênica. No entanto, muitas regiões intergênicas apresentam um tamanho superior a 100 pb (Figura 4.4), o que pode estar relacionado à ocorrência de reguladores internos nas UTs (PRICE *et al.*, 2006; OKUDA *et al.*, 2007). Conseqüentemente, maior será a complexidade da regulação da transcrição, com formação de transcritos alternativos, fato que possivelmente ocorra em *M. hyopneumoniae*.

Neste trabalho, primeiramente foram sugeridas como pertencentes a uma mesma UT ORFs com distância intergênica de até 100 pb entre elas (Figura 4.1). Porém, com a realização das análises experimentais, observou-se que, o critério da distância intergênica não é válido para *M. hyopneumoniae*, pois a transcrição parece ocorrer de maneira contínua nesta bactéria (Figura 4.3. B), em extensas UTs numa mesma orientação (Figura

4.3 C), sendo interrompida apenas quando existir uma UT ou ORF na fita oposta (Figura 4.3 D).

A determinação *in silico* das distâncias intergênicas, como critério para a organização de UTs, se apresenta como a metodologia mais confiável para predições de UTs em *E. coli* e *B. subtilis* (BROUWER *et al.*, 2008), sendo por isso, o critério mais difundido e, conseqüentemente, empregado neste trabalho. A distância intergênica usada para a predição de UTs, e descrita na literatura, é muito variável, dependendo do microrganismo e do método computacional empregado. Analisando o genoma de *E. coli*, MORENO-HAGELSIEB & COLLADO-VIDES (2002) determinaram que ORFs co-transcritas estariam separadas por, no máximo, distâncias intergênicas de 20 pb. Porém, estudos subsequentes demonstraram que as distâncias intergênicas são variáveis entre as espécies bacterianas (RAGOZIN *et al.*, 2002), de modo que, o modelo de *E. coli* pode não ser efetivo para outras espécies. Os estudos de PRICE *et al.* (2005b) demonstraram que os genomas de *E. coli* e de *Helicobacter pylori* apresentam similaridade quanto a estas distâncias, sendo que as RIs entre ORFs co-transcritas tem no máximo 50 pb de distância. Neste mesmo trabalho, distâncias de até 20 pb foram encontradas em genomas como o de *Halobacterium* (PRICE *et al.*, 2005b).

Análises do genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (predição a partir de dados de *microarray*) demonstraram que as UTs apresentam RIs de até 130 pb (ROBACK *et al.*, 2007). CHEN *et al.* (2004), utilizando análises comparativas em genomas de *Haemophilus influenzae* e *Salmonella typhimurium*, determinaram distâncias entre genes co-transcritos de até 150 pb. No genoma de *Campylobacter jejuni*, a partir da análise do perfil de expressão gênica poucas UTs foram encontradas (THOMPSON *et al.*, 2003). No entanto, PRICE *et al.* (2005b) observaram um claro excesso de pares de ORFs fisicamente próximas na mesma fita, o que é indicativo de intensa organização gênica em UTs de *C. jejuni*.

Analisando o número de pares de ORFs na mesma fita de DNA, foi estimado que 48% destes pares formam UTs em *Synechocystis* (PRICE *et al.*, 2005b), sugerindo, portanto, que as UTs conservadas nesta espécie têm grandes distâncias intergênicas, podendo chegar a 300 pb. Na tentativa de explicar esta variabilidade de distâncias intergênicas, os autores sugerem que o modelo de análise *in silico*, através dos tamanhos das RIs, não se apresenta adequado para organismos que utilizam códons alternativos,

como no caso de *Synechocystis*. Apesar de considerarem a distribuição das UTs em *Synechocystis* não usual, os autores afirmam que isso corresponde a um reflexo de diferenças biológicas na estrutura deste genoma (PRICE *et al.*, 2005b). Estas informações diferentes sugerem que as distâncias intergênicas que separam ORFs pertencentes à uma mesma UT são muito variáveis para cada microrganismo, dependendo da complexidade dos mecanismos empregados na regulação gênica de cada célula.

Uma das regiões do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 (Figura 4.3 B) foi comparada com a região equivalente no genoma de outros dois isolados desta mesma espécie (cepas J e 232). A conservação organizacional da região se apresenta quase absoluta entre os genomas das três cepas de *M. hyopneumoniae* (Figura 4.5). Segundo critérios empregados nas análises de CHEN *et al.* (2004), PRICE *et al.* (2005b) e ROBACK *et al.* (2007), uma das características para a determinação de uma UT é a conservação desta em dois ou mais genomas filogeneticamente relacionados. Assim, a conservação encontrada nos genomas das três cepas de *M. hyopneumoniae* sugere que esta característica é relevante para esta espécie.

Com o objetivo de confirmar a presença de transcritos policitrônicos, foi utilizada a metodologia de síntese de cDNA com o *Kit SMARTTM*, porém não foram obtidos resultados satisfatórios nestas análises. Esta dificuldade, em amplificar grandes moléculas de mRNA, pode ser devido à instabilidade, degradação e/ou processamento de longas moléculas. Estes fatores também influem negativamente no emprego de outras técnicas como o *northern blot* (WALDO III *et al.*, 1999; AGUENA *et al.*, 2002; MUSATOVOVA *et al.*, 2003; HOON *et al.*, 2005). Outra justificativa pode estar relacionada a ocorrência de processamento pós-transcricional de mRNAs policitrônicos, através de clivagens endonucleotídicas, que já foi descrita para diversas espécies bacterianas (AGUENA *et al.*, 2002; AGUENA & SPIRA, 2009).

Através da análise experimental de 21 UTs do genoma de *M. hyopneumoniae* (Figura 4.2; Figura 4.3 B; Apêndice B), pode-se sugerir que a transcrição nesta espécie ocorre sem a interferência de sinais de terminação da transcrição, sendo guiada apenas pela presença de possíveis sequências promotoras. Até o momento, não existem informações definitivas dos mecanismos de término da transcrição no gênero *Mycoplasma*. A partir de um estudo da UT do gene *ftsZ*, em *M. pneumoniae* e *M. genitalium*, foi concluído que nestas duas espécies, genes com funções relacionadas em uma UT terão sempre na região

5' uma sequência promotora da transcrição, porém, raramente ocorre a presença de terminadores da transcrição na região 3' (BENDERS *et al.*, 2005). Portanto, genes funcionalmente não relacionados podem ser co-transcritos em longas UTs, pois os sinais da terminação da transcrição são fracos, ocasionando uma discreta e ineficiente parada da transcrição (MADEIRA & GABRIEL, 2007).

Através das análises realizadas, foi demonstrado que, em alguns casos, as unidades de transcrição e os genes transcritos individualmente, em micoplasmas, não apresentam sua organização relacionada à sua função na célula. A DNA girase, que apresenta duas subunidades, é a enzima catalisadora do dobramento das fitas de DNA (supertorção). A localização das ORFs codificadoras destas subunidades, em diferentes espécies de micoplasmas, é um exemplo desta heterogeneidade. Em *M. hyopneumoniae* 7448, a subunidade A da DNA girase é codificada em um mRNA monocistrônico (Apêndice C), e a ORF codificadora da subunidade B, é transcrita em um mRNA policistrônico posicionada a aproximadamente 553 Kb de distância da ORF da subunidade A. Os genes que codificam as subunidades da girase estão organizados de modo muito semelhante nos genomas da cepa J e da cepa 232 de *M. hyopneumoniae*, sendo a subunidade A da DNA girase codificada em um mRNA monocistrônico e, a subunidade B, codificada em um mRNA policistrônico. As duas ORFs estão separadas por distâncias de 537 Kb na cepa J (acesso: NC_007295) e 389 Kb na cepa 232 (acesso: NC_006360). Já no genoma de *Mycoplasma synoviae* (acesso: NC_007294) as duas subunidades estão separadas por 435 Kb, porém, ambas pertencem à duas diferentes UTs, sendo codificadas em um mRNA policistrônico. Em *M. pneumoniae* (acesso: NC_000912) e *M. genitalium* (acesso: NC_000908), as ORFs codificadoras das duas subunidades da DNA girase estão adjacentes uma a outra, pertencendo a uma longa UT formada por genes com funções também relacionadas ao mecanismo de replicação.

A holoenzima RNA polimerase é o componente central na regulação da transcrição bacteriana, sendo formada por quatro subunidades. As ORFs, codificadoras destas subunidades, estão localizadas muito distantes uma das outras no genoma de *M. hyopneumoniae*, bem como em outros micoplasmas. Todas as ORFs são co-transcritas com outras ORFs, formando grandes UTs com produtos de função variada. Apenas os genes *rpoB* e *rpoC* são co-transcritos na mesma UT. Interessantemente, todas as regiões codificadoras de subunidades da RNA polimerase estão localizadas na fita reversa do DNA

dos genomas de micoplasmas, exceto a ORF codificadora da subunidade sigma que está localizada na fita direta.

Recentemente, GÜELL *et al.* (2009) analisaram a organização do transcriptoma de *M. pneumoniae*, onde os resultados obtidos são concordantes com os resultados em *M. hyopneumoniae* apresentados neste trabalho. Através da análise do transcriptoma de *M. pneumoniae* foi verificada uma organização complexa da coordenação da transcrição. O padrão de expressão nas UTs de *M. pneumoniae* varia significativamente, ocorrendo mudanças na estrutura das UTs, as quais geram os transcritos alternativos em resposta a mudanças ambientais. RNAs antisense foram encontrados com grande frequência no genoma, podendo ser consistentes com estas mudanças de padrão de expressão determinando uma regulação transcricional complexa (GÜELL *et al.*, 2009).

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, é possível sugerir que a transcrição gênica em *M. hyopneumoniae* ocorre de forma contínua em toda a extensão de uma fita de DNA, formando extensas UTs. Assim, a transcrição parece ser guiada por sequências promotoras, sendo o critério de organização das UTs a presença de ORFs na mesma fita de DNA, até a ocorrência de uma ORF na fita oposta, quando a transcrição passa a ocorrer nesta fita oposta, iniciando uma nova UT. Além disso, foram evidenciados transcritos alternativos, ou subunidades de transcrição, o que provavelmente, esteja relacionado à regulação da transcrição por mecanismos complexos.

6. PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste trabalho são considerados preliminares à realização de uma análise do transcriptoma de *M. hyopneumoniae*, objetivando a confirmação dos nossos resultados, além da compreensão da regulação transcricional neste importante patógeno, que inclui a determinação de elementos regulatórios (promotores e terminadores), assim como a caracterização do padrão de expressão gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.; PITZER, J. & MINION, F. C. In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection Immunity*, 73(11): 7784–7787, 2005.
- AGUENA, M.; YAGIL, E. & SPIRA, B. Transcriptional analysis of the pst operon of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268: 518–524, 2002.
- AGUENA, M. & SPIRA, B. Transcriptional Processing of the pst Operon of *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 58: 264–267, 2009.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402, 1997.
- BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGNA, N. L.; GIRON, J. A. & THOMAS, C. A. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microbial Pathogenesis*, 19(2): 105-116, 1995.
- BASEMAN, J. B. & TULLY, J. G. *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging Infection Disease*, 3(1): 21-32, 1997.
- BENDERS, G. A.; POWELL, B. C. & HUTCHISON III, C. A. Transcriptional analysis of the conserved *ftsZ* gene cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal Bacteriology*, 187: 4542-4551, 2005.
- BOVE, J. M. Molecular features of mollicutes. *Clinical Infection Disease*, 17(1): S10-S31, 1993.
- BROUWER, R. W. W.; KUIPERS, O. P. & VAN HIJUM, S. A. F. T. The relative value of operon predictions. *Briefings in Bioinformatics*, 9(5): 367-375, 2008.
- BUTLAND, G.; PEREGRIN-ALVAREZ, J. M.; LI, J.; YANG, W.; YANG, X.; CANADIEN, V.; STAROSTINE, A.; RICHARDS, D.; BEATTIE, B.; KROGAN, N.; DAVEY, M.; PARKINSON, J.; GREENBLATT, J. & EMILI, A. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*, 433: 531-537, 2005.
- CHEN, X.; SU, Z.; DAM, P.; PALENIK, B.; XU, Y. & JIANQ, T. Operon prediction by comparative genomics: an application to the *Synechococcus* sp. WH8102 genome. *Nucleic Acids Research*, 32: 2147–2157, 2004.
- CHO, B. K.; KNIGHT, E. M.; BARRETT, C. L. & PALSSON, B. O. Genome-wide analysis of Fisbinding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome Research*, 18: 900–910, 2008a.

- CHO, B. K.; BARRETT, C. L.; KNIGHT, E. M.; PARK, Y. S. & PALSSON, B. Ø. Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 105: 19462–19467, 2008b.
- CHO, B. K.; ZENGLER, K.; QIU, Y.; PARK, Y. S.; KNIGHT, E. M.; BARRETT, C. L.; GAO, Y. & PALSSON, B. Ø. The transcription unit architecture of the *Escherichia coli* genome. *Nature Biotechnology*, 27(11): 1043-1049, 2009.
- CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R. & DE LA, G. M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Canadian Journal Veterinary Research*, 52(4): 434-438, 1988.
- CRAVEN, M.; PAGE, D.; SHAVLIK, J.; BOCKHORST, J. & GLASNER, J. A probabilistic learning approach to whole-genome operon prediction. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 8: 116-127, 2000.
- DEBEY, M.; JACOBSON, C. D. & ROSS, R. F. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Journal Veterinary Research*, 53: 1705-1710, 1992.
- DHANDAYUTHAPANI, S.; RASMUSSEN, W. G. & BASSEMAN, J. B. Identification of mycoplasmal promoters in *Escherichia coli* using a promoter probe vector with Green Fluorescent Protein as reporter system. *Gene*, 215: 213-222, 1998.
- DJORDJEVIC, S. P.; CORDWELL, S. J.; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J. & MINION, F. C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infection Immunity*, 72(5): 2791-2802, 2004.
- DYBVIG, K. & VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annual Review Microbiology*, 50: 25-57, 1996.
- EYRE-WALKER, A. The distance between *Escherichia coli* genes is related to gene expression levels. *Journal Bacteriology*, 177: 5368-5369, 1995.
- FAITH, J. J.; HAYETE, B.; THADEN, J. T.; MOGNO, I.; WIERZBOWSKI, J.; COTTAREL, G.; KASIF, S.; COLLINS, J. J. & GARDNER, T. S. Large-scale mapping and validation of *Escherichia coli* transcriptional regulation from a compendium of expression profiles. *PLoS Biology*, 5(1): 54-66, 2007.
- FANI, R.; BRILLI, M. & LIÒ, P. The origin and evolution of operons: the piecewise building of the proteobacterial histidine operon. *Journal Molecular Evolution*, 60: 378-390, 2005.
- FANI, R. & FONDI, M. Origin and evolution of metabolic pathways. *Physics of Life Reviews*, 6: 23-52, 2009.

FAUBLADIER, M.; CAM, K. & BOUCHE, J. P. *Escherichia coli* cell division inhibitor DicF-RNA of the dicB operon. Evidence for its generation in vivo by transcription termination and by RNase III and RNase E-dependent processing. *Journal of Molecular Biology*, 212: 461–471, 1990.

FEIST, A. M.; HERRG M. J.; THIELE, I.; REED, J. L. & PALSSON, B. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *National Review Microbiology*, 7: 129–143, 2009.

FINCH, L. R. & MITCHELL, A. Sources of nucleotides In: J.Maniloff; R.N.McElhaney; L.R.Finch & J.B.Baseman, editors. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., 1992. p. 211-230.

FONDI, M.; EMILIANI, G. & FANI, R. Origin and evolution of operons and metabolic pathways, *Research in Microbiology*, 160: 502-512, 2009.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A., III & VENTER, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270(5235): 397-403, 1995.

FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 27(6): 337-339, 1975.

FUJITA, K.; BABA, T. & ISONO, K. Genomic analysis of the genes encoding ribosomal proteins in eight eubacterial species and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Informatics*, 9: 3-12, 1999.

GAMPER, M. & HAAS, D. Processing of the *Pseudomonas arc*-DABC mRNA requires functional RNase E in *Escherichia coli*. *Gene*, 129: 119–122, 1993.

GIL, R.; SILVA, F. J.; PERETO, J. & MOYA, A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3): 518-537, 2004.

GRAINGER, D.C.; HURD, D.; HARRISON, M.; HOLDSTOCK, J. & BUSBY, S. J. W. Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 102: 17693–17698, 2005.

GÜELL, M.; NOORT, V.; YUS, E.; CHEN, WEI-HUA, LEIGH-BELL, J.; MICHALODIMITRAKIS, K.; YAMADA, T.; ARUMUGAM, M.; DOERKS, T.; KÜHNER, S.; RODE, M.; SUYAMA, M.; SCHMIDT, S.; GAVIN, A. C.; BORK, P. &

- SERRANO, L. Transcriptome Complexity in a Genome-Reduced Bacterium. *Science*, 326(5957): 1268-1271, 2009.
- HALBEDEL, S.; EILERS, H.; JONAS, B.; BUSSE, J.; HECKER, M.; ENGELMANN, S. & STULKE, J. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: Analysis of the Promoters of the ackA and ldh Genes. *Journal of Molecular Biology*, 371(3): 596-607, 2007.
- HAZKANI-COVO, E. & GRAUR, D. Evolutionary conservation of bacterial operons: Does transcriptional connectivity matter? *Genetica*, 124: 145–166, 2005.
- HIMMELREICH, R.; PLAGENS, H.; HILBERT, H.; REINER, B. & HERRMANN, R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Research*, 25: 701–712, 1997.
- HOON, M.; IMOTO, S.; KOBAYASHI, K.; OGASAWARA, N. & MIYANO, S. Inferring gene regulatory networks from time-ordered gene expression data of *Bacillus subtilis* using differential equations. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 8: 17-28, 2003.
- HOON, M.; MAKITA, Y.; IMOTO, S.; KOBAYASHI, K.; OGASAWARA, N.; NAKAI, K. & MIYANO, S. Predicting gene regulation by sigma factors in *Bacillus subtilis* from genome-wide data. *Bioinformatics*, 20(1): 101-108, 2004a.
- HOON, M.; IMOTO, S.; KOBAYASHI, K.; OGASAWARA, N. & MIYANO, S. Predicting the operon structure of *Bacillus subtilis* using operon length, intergene distance, and gene expression information. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 9: 276-287, 2004b.
- HOON, M. J. L.; MAKITA, Y.; NAKAI, K. & MIYANO, S. Prediction of Transcriptional Terminators in *Bacillus subtilis* and Related Species. *Plos Computacional Biology*, 1(3): 212-221, 2005.
- INAMINE, J. M.; LOECHEL, S. & HU, P. C. Analysis of the nucleotide sequence of the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene*, 73: 175–183, 1988.
- ISHIHAMA, Y.; SCHMIDT, T.; RAPPSILBER, J.; MANN, M.; HARTL, F. U.; KERNER, M. J. & FRISHMAN, D. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics*, 9(102): 1-17, 2008.
- ITOH, T.; TAKEMOTO, K.; MORI, H. & GOJOBORI, T. Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Molecular Biology Evolution*, 16: 332-346, 1999.
- JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal Molecular Biology*, 3: 318-356, 1961.
- LAWRENCE, J. G. & ROTH, J. R. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, 143: 1843-1860, 1996.

- LAWRENCE, J. Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9: 642-648, 1999.
- LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; WEAR, D. J.; NEWTON III, P. B.; TULLY, J. G. & SHIH, J. W. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Modern Pathology*, 6(3): 276-280, 1993.
- MADEIRA, H. M. F. & GABRIEL, J. E. Regulation of gene expression in Mycoplasmas: Contribution from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae* genome sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 277-282, 2007.
- MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L. & MINION, C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology*, 152: 937-944, 2006a.
- MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; EDWARDS, R. & MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infection and Immunity*, 74: 160-166, 2006b.
- MADSEN, M. L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E. L.; CARRUTHERS, M. D. & MINION, C. Transcriptome Changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infection and Immunity*, 76: 658-663, 2008.
- MANOLUKAS, J. T.; BARILE, M. F.; CHANDLER, D. K. & POLLACK, J. D. Presence of anaplerotic reactions and transamination, and the absence of the tricarboxylic acid cycle in mollicutes. *Journal of General Microbiology*, 134(3): 791-800, 1988.
- MEDINI, D.; SERRUTO, D.; PARKHILL, J.; RELMAN, D. A.; DONATI, C.; MOXON, R.; FALKOW, S. & RAPPUOLI, R. Microbiology in the post-genomic era. *Nature Review Microbiology*, 6: 419-430, 2008.
- MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M. & MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of Bacteriology*, 186(21): 7123-7133, 2004.
- MORENO-HAGELSIEB, G. & COLLADO-VIDES, J. A powerful nonhomology method for the prediction of operons in prokaryotes. *Bioinformatics*, 18(1): 329-336, 2002.
- MUSATOVOVA, O; DHANDAYUTHAPANI, S. & BASEMAN, J. B. Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1): 73-81, 2003.
- MUSHEGIAN, A. R. & KOONIN, E. V. Gene order is not conserved in bacterial evolution. *Trends Genetics*, 12: 289-290, 1996.

NAURECKIENE, S. & UHLIN, B. E. In vitro analysis of mRNA processing by RNase E in the pap operon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 21: 55–68, 1996.

NCBI:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2&type=0&name=Complete%20Bacteria>>. Acesso em 10.01.2010.

OKUDA, S.; KAWASHIMA, S.; KOBAYASHI, K.; OGASAWARA, N.; KANEHISA, M. & GOTO, S. Characterization of relationships between transcriptional units and operon structures in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, 8(48), 2007.

OMELCHENKO, M. V.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; ROGOZIN, I. B. & KOONIN, E. V. Evolution of mosaic operons by horizontal gene transfer and gene displacement *in situ*. *Genome Biology*, 4(9): R55, 2003.

OSAWA, S.; JUKES, T. H.; WATANABE, K. & MUTO, A. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiology Review*, 56(1): 229-264, 1992.

PÁL, C. & HURST, L. D. Evidence against the selfish operon theory. *TRENDS in Genetics*, 20(6): 232-234, 2004.

PITCHER, D. G. & NICHOLAS, R. A. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? *Veterinary Journal*, 170(3): 300-306, 2005.

POLLACK, J. D. Carbohydrate metabolism and energy conservation In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R. & BASEMAN, J. B., editors. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., 1992. p. 181-200.

PRICE, M. N.; HUANG, K. H.; ARKIN, A. P. & ALM, E. J. Operon formation is driven by co-regulation and not by horizontal gene transfer. *Genome Research*, 15(6): 809–819, 2005a.

PRICE, M. N.; HUANG, K. H.; ARKIN, A. P. & ALM, E. J. A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 33: 880-892, 2005b.

PRICE, M. N.; ARKIN, A. P. & ALM, E. J. The life-cycle of operons. *PLoS Genetics*, 2(6): 859-873, 2006.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S. & ARKIN, A. P. Horizontal gene transfer and the evolution of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Genome Biology*, 9(1): R4.1-R4.20, 2008.

RAZIN, S.; YOGEV, D. & NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology Molecular Biology Review*, 62(4): 1094-1156, 1998.

RAZIN, S. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes) In: DWORKIN, M; FALKOW, S; ROSENBERG, E; SCHLEIFER, K & STACKBRANDT, E, editors. *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006. p. 836-904.

- ROBACK, P.; BEARD, J.; BAUMANN, D.; GILLE, C.; HENRY, K.; KROHN, S.; WISTE, H.; VOSKUIL, M. I.; RAINVILLE, C. & RUTHERFORD, R. A predicted operon map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 35: 5085–5095, 2007.
- ROGOZIN, I. B.; MAKAROVA, K. S.; MURVAI, J.; CZABARKA, E. & WOLF, Y. I. Connected gene neighborhoods in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 30: 2212–2223, 2002.
- ROTTEM, S. & YOGEV, D. Mycoplasma interaction with eukaryotic cells. *Subcellular Biochemistry*, 33: 199-227, 2000.
- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A. & BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16: 944-945, 2000.
- SABATTI, C.; ROHLIN, L.; OH, M. K. & LIAO, J. C. Co-expression pattern from DNA microarray experiments as a tool for operon prediction. *Nucleic Acids Research*, 30: 2886-2893, 2002.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SASAKI, Y.; ISHIKAWA, J.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; KENRI, T.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; HORINO, A.; SHIBA, T.; SASAKI, T. & HATTORI, M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research*, 30(23): 5293-5300, 2002.
- SKAMROV, A.; FEOKTISTOVA, E.; GOLDMAN, M. & BEABEALASHVILLI, R. *Mycoplasma gallisepticum rpoA* gene cluster. *FEMS Microbiology Letters*, 208(2): 281–285, 2002.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; CARVALHO, L. F. & OLIVEIRA, S. J. *Clínica e Patologia Suína*. Goiânia: Art 3 impressos especiais, 1999.
- STADEN, R.; JUDGE, D. P. & JAMES, K. *Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS*. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach. Totawa: Human Press Inc, 2003. p.550
- SWAIN, P. S. Efficient attenuation of stochasticity in gene expression through post-transcriptional control. *Journal Molecular Biology*, 344: 965-976, 2004.
- THACKER, E. L. Mycoplasmal disease In: STRAW, B. E.; ZIMMERMANN, J. J.; D'ALLAIRE, S. & TAYLOR, D. J, editors. *Diseases fos Swine*. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 701-717.
- THOMPSON, L. J.; MERRELL, D. S.; NEILAN, B. A.; MITCHELL, H.; LEE, A. FALKOW, S. Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-

dependent switch in virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 71: 2643–2655, 2003.

TYPAS, A.; NICHOLS, R. J.; SIEGELE, D. A.; SHALES, M.; COLLINS, S. R.; LIM, B.; BRABERG, H.; YAMAMOTO, N.; TAKEUCHI, R.; WANNER, B. L.; MORI, H.; WEISSMAN, J. S.; KROGAN, N. J. & GROSS, C. A. High-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*. *Nature Methods*, 5: 781–787, 2008.

VALIATI, J. Redes neurais aplicadas ao reconhecimento de regiões promotoras na família Mycoplasmataceae. Tese (Doutorado em Ciência da Computação) - Programa de Pós-Graduação em Computação, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

VASCONCELOS, A. T.; FERREIRA, H. B.; BIZARRO, C. V.; BONATTO, S. L.; CARVALHO, M. O.; PINTO, P. M.; ALMEIDA, D. F.; ALMEIDA, L. G.; ALMEIDA, R.; VES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E. N.; AZEVEDO, V. A.; BOGO, M. R.; BRIGIDO, M. M.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, S. S.; CAREPO, M. S.; CARRARO, D. M.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R. G.; CUNHA, C. W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M. S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T. B.; GRISARD, E. C.; GUIMARAES, C. T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S. N.; KRIEGER, M. A.; LAURINO, J. P.; LIMA, L. F.; LOPES, M. I.; LORETO, E. L.; MADEIRA, H. M.; MANFIO, G. P.; MARANHÃO, A. Q.; MARTINKOVICS, C. T.; MEDEIROS, S. R.; MOREIRA, M. A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C. E.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXAO, R. F.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L. S.; POTRICH, D. P.; SALIM, A. C.; SANTOS, F. R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M. P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S.; SCHUCK, A. F.; SEUANEZ, H. N.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SILVA, S. C.; SOARES, C. M.; SOUZA, K. R.; SOUZA, R. C.; STAATS, C. C.; STEFFENS, M. B.; TEIXEIRA, S. M.; URMENYI, T. P.; VAINSTEIN, M. H.; ZUCCHERATO, L. W.; SIMPSON, A. J. & ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, 187(16): 5568-5577, 2005.

VICENTE, M.; GOMEZ, M. J. & AYALA, J. A. Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* *dwc* cluster. *Cell Molecular Life Science*, 54: 317-324, 1998.

WALDO III, R. H.; POPHAM, P. L.; ROMERO-ARROYO, C. E.; MOTHERSHED, E. A.; LEE, K. K. & KRAUSE, D. C. Transcriptional analysis of the *hmv* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 181(16): 4978-4985, 1999.

WALDO III, R. H. & KRAUSE, D. C. Synthesis, Stability, and Function of Cytoadhesin P1 and Accessory Protein B/C Complex of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 188(2): 569–575, 2006.

WALKER, R. L. Mollicutes. In: HIRSH, D.C.; CHUNG, Y. *Microbiologia veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 155-162

WASHIO, T., J.; SASAYAMA, J. & TOMITA, M. Analysis of complete genomes suggests that many prokaryotes do not rely on hairpin formation in transcription termination. *Nucleic Acids Research*, 26: 5456–5463, 1998.

WEINER III, J.; HERRMANN, R. & BROWNING, G. F. Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 28(22): 4488-4496, 2000.

WESTOVER, B.; BUHLER, J.; SONNENBURG, J. & GORDON, J. Operon prediction without a training set. *Bioinformatics*, 21(7): 880-888, 2005.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiology Review*, 51(2): 221-271, 1987.

WOLF, M.; MULLER, T.; DANDEKAR, T. & POLLACK, J. D. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 54(3): 871-875, 2004.

YAMAO, F.; MUTO, A.; KAWAUCHI, Y.; IWAMI, M.; IWAGAMI, S.; AZUMI, Y. & OSAWA, S. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, 82(8): 2306-2309, 1985.

ZHENG, Y.; SZUSTAKOWSKI, J. D.; FORTNOW, L.; ROBERTS, R. J. & KASIF, S. Computational identification of operons in microbial genomes. *Genome Research*, 12(8): 1221-1230, 2002.

ZIELINSKI, G. C.; YOUNG, T.; ROSS, R. F. & ROSENBUSCH, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. *American Journal Veterinary Research*, 51(3): 339-343, 1990.

ANEXOS

ANEXO A - Protocolo de extração de DNA genômico de *M. hyopneumoniae*

- Centrifugar 5 ml de cultura por 30 minutos a 3360 g;
- Ressuspender as células em 1 ml de tampão TE;
- Homogeneizar em Vórtex;
- Dividir em 2 tubos grandes (1,7 ou 2,0 ml);
- Adicionar para cada tubo: 15 µl de SDS 10% e 1,5 µl proteinase K (20 m/ml);
- Misturar invertendo gentilmente o tubo;
- Incubar por 1 hora a 37°C;
- Adicionar: 100 µl NaCl 5 M e 80 µl de CTAB 1%
- Incubar 10 minutos à 65°C;
- Adicionar 1 volume de fenol:clorofórmio;
- Inverter gentilmente o tubo;
- Centrifugar 5 minutos 13.000 rpm;
- Transferir o sobrenadante para outro tubo;
- Adicionar 800 µl de clorofórmio;
- Inverter gentilmente o tubo;
- Centrifugar 5 minutos 13.000 rpm;
- Transferir o sobrenadante para outro tubo;
- Adicionar 600 µl de isopropanol gelado, misturar invertendo gentilmente o tubo;
- Deixar a -20°C por pelo menos overnight ou 1 hora à -80°C;
- Centrifugar 13.000 rpm, 5 minutos;
- Lavar com etanol 70% gelado; (Adicionar 500 µl de etanol 70% sem agitar e centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos; depois descartar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar mais 500 µl de Etanol 70%) Repetir 2 X;
- Secar (pode ser em estufa até 37°C);
- Ressuspender o pellet em 10-30 µl de água autoclavada e colocar na geladeira por 3 horas;
- Adicionar 3 µl de RNase (10 mg/ml) e incubar a 37°C por 1 hora;
- Checar 10% do volume em gel de agarose 0,8% - 60 V.

ANEXO B - Gel desnaturante de formaldeído

Fundir a agarose com água DEPC. Em um falcon, misturar o total de formaldeído com o total de MOPS e incubar em banho-maria à 65°C, acrescentar à agarose fundida a mistura de MOPS e formaldeído previamente aquecidos e homogeneizar. Verter o gel em forma com pentes.

Aplicar no gel, aproximadamente 1 µg de RNA total, com MOPS 10X, 37% de formaldeído, formamida PA e Brometo de Etídio (1 mg/ml), incubado a 65°C por 15 minutos e após, imediatamente incubado no gelo 5 minutos. Adiciona à cada amostra 2 µl de tampão de amostra 10 X.

APÊNDICES

APÊNDICE A - *Primers* empregados nos experimentos de RT-PCR.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do Produto (pb)	T _m (°C)
30 1° F	5' GGTGGTAGACAACCTTAAAG 3'	487	47,4
30 1° R	5' ACAATTCCATCAACAAGG 3'		47,6
55 1° F	5' GCGGAATGACGGTAAACG 3'	1204	54,0
55 1° R	5' GTAAAAATTCACGGATCAGCAG 3'		52,2
55 2° F	5' CGCCTGGAGAATAAAGGTG 3'	1295	53,2
55 2° R	5' CTAAGGGAGAACCTGCATCTG 3'		54,9
55 3° F	5' CGGCTAAAAAATGAGAAGG 3'	794	48,9
55 3° R	5' CCATTATGCCCTAGAATTGC 3'		51,2
55 4° F	5' GCCAAAAGCAAAGAGTAGC 3'	759	52,1
55 4° R	5' GGAGTTCCCATTGAAACAGC 3'		54,1
55 5° F	5' GCAAGACAATCATTCTGGCAAC 3'	734	55,0
55 5° R	5' GCATAAATTCGGATCGCC 3'		51,5
55 6° F	5' GTATTAGCGTTTTCTCGGGC 3'	838	53,8
55 6° R	5' CGCTTGCAGCATTACGG 3'		54,7
55 7° F	5' GGAAAATTGAGCAAACCACG 3'	504	52,8
55 7° R	5' CTGAGTTGCATACTCAAAAAGGG 3'		53,8
116 1° F	5' GCTGTTGAAGTTCTTCGG 3'	442	52,5
116 1° R	5' CTAGGCTAGTTATTTCCCC 3'		55,4
116 2° F	5' ATAATGTCGAATCCCTTTCTGG 3'	582	52,3
116 2° R	5' ACAAGTAGCATCCCCATTGC 3'		48,0
116 3° F	5' GCACTTGCTGGATTTTCTTC 3'	508	46,0
116 3° R	5' TTTATGGGTGACTTCAAAAAG 3'		47,3
116 4° F	5' AGCCGATCAGATAATAATTG 3'	513	51,2
116 4° R	5' CTTTTTGATAATCAGCCG 3'		49,1
118 1° F	5' GGCAATCAAAGCCGCAG 3'	1002	55,1
118 1° R	5' GGGTTGAAAGATCGACTTTAAG 3'		51,4
118 2° F	5' GGCGTTTTAATTACACCG 3'	765	49,0
118 2° R	5' CATCAAGGTCATAAATGCG 3'		49,0
118 3° F	5' GAAAAGACGATGGGGGC 3'	618	53,5
118 3° R	5' GCATAATCCTTTGCCTCCG 3'		53,8
125 1° F	5' GAGGAATCAGATGAAAGC 3'	1394	47,6
125 1° R	5' GCAATTTGGTAGTTAGTCC 3'		48,9
125 2° F	5' CGTTGATGTTGTAATTGGTGG 3'	733	52,2
125 2° R	5' GCAGCTAAAATGTACCAAGAC 3'		51,7
125 3° F	5' CTGTTTTGTGGTATTTCTGG 3'	1437	49,8

Continuação APÊNDICE A

125 3°R	5' CCAGCACCACCACCTAAG 3'		55,6
128 1° F	5' CTATCAAAAAATGGCAGCAG 3'	453	49,8
128 1° R	5' CGCCGAAACAATCATTG 3'		49,3
129 1°F	5' GTGAAAATGATGCTTATTTTGC 3'	403	49,2
129 1°R	5' CCCATTCATTCTTAGATGTG 3'		48,3
130 1° F	5' TGATTCGGCTCTAAATGAGG 3'	635	54,2
130 1° R	5' CCTGAAAAAAGGAAGACGCC 3'		52,0
130 2° F	5' CGAGTTTGGAACTCATATC 3'	543	49,2
130 2° R	5' GAGTCTAATTTGATCGTTGATG 3'		47,7
130 3° F	5' GAATTGGGAATGAATATCGG 3'	493	53,2
130 3° R	5' AAGTGAATCAGGAGTTTTATTCG 3'		48,6
130 4° F	5' CAAAATTAGTCCATTATTAGTG 3'	412	45,0
130 4° R	5' CTTTGTAGAGTTTATTACCTGC 3'		48,9
130 5° F	5' ATCTTGTAGCAAATAAGGGG 3'	567	51,1
130 5° R	5' TGCATATGAAATTCCAAGACTG 3'		49,7
135 1° F	5' CAAAGTCCATTAACAACACTCGC 3'	703	53,0
135 1° R	5' GCGACGATCAGTGCCAATC 3'		56,6
135 2° F	5' CTTTTGGGGCAACTTCCG 3'	539	54,4
135 2° R	5' CGGGACGATGAACCTCTC 3'		54,9
135 3° F	5' GGCATAAAATTCCAGCCG 3'	840	51,8
135 3° R	5' GCTCCAGCCATCAAGTTTC 3'		54,0
135 4° F	5' GGTGCCCCCACTTTTAGC 3'	1068	56,6
135 4° R	5' CAGCAACTGTAAGTCCACTCAG 3'		55,4
135 5° F	5' CGAGAGATTTGCCAGCG 3'	452	53,8
135 5° R	5' GGGCTTGTTTTCTGGTTT 3'		52,3
140 1° F	5' GATCAAATTGAGGTCAAATC 3'	377	46,8
140 1° R	5' CAACTATTCCAATGGATAAAG 3'		46,5
140 2° F	5' GTCAGCTCGAAGTCTTG 3'	356	50,0
140 2° R	5' GCTCGGCTAACTTATTCTTG 3'		51,0
140 3° F	5' GAAACCCGATCAAGAACAG 3'	405	50,9
140 3° R	5' CGAAATTCCGATATTTACG 3'		46,1
140 4° F	5' ACCAAATCAATCCAAATCA 3'	394	47,0
140 4° R	5' GTTCCTCAAGTTTACTGCC 3'		51,4
140 5° F	5' GTTATTGTCCATGAACTTG 3'	287	46,1
140 5° R	5' CATCAATATCTGTGATATTATG 3'		44,2
140 6° F	5' CGTTTGGACCCCGAAAG 3'	455	53,7
140 6° R	5' GCAGTTCTAATGATATTTCC 3'		46,0
140 7° F	5' CTAAATGTGACAGTTGCGAC 3'	290	51,6
140 7° R	5' CAAACTCGGATCAAATCTTC 3'		49,6
140 8° F	5' CAACCGAATTACTAGCAATC 3'	293	48,8

Continuação APÊNDICE A

140 8° R	5' GCAGACGACTTTGCACTG 3'		54,2
140 9° F	5' CCGTAAATCAACCTTACATC 3'		44,9
140 9° R	5' CGTATTTTATCCGATTTTTG 3'	378	48,5
141 1° F	5' CAGCAAAGTCCTTCGTG 3'		50,9
141 1° R	5' GGAAGTGTATCTGTTGTTGTC 3'	621	51,1
142 1° F	5' GAATCGCCAACCTTGACC 3'		51,6
142 1° R	5' GGTTCCACAACCTATTTTCG 3'	263	50,9
142 2° F	5' GACCTCAACAGCTTGATTTGG 3'		54,1
142 2° R	5' CGGGCAACTGATGATTTCC 3'	706	54,0
142 3° F	5' CAGCCGTTGTC AATTAC 3'		48,3
142 3° R	5' GATTATCAGTCGTGTGCTC 3'	357	50,4
144 1° F	5' CTGTTGTTCTAGCCGCTAC 3'		53,0
144 1° R	5' GTTTCTTCATTAATCCAGC 3'	1188	47,0
144 2° F	5' GATCAAGGTTCTATGCCAC 3'		50,5
144 2° R	5' CTTACAGGTT CAGCAAAGG 3'	410	50,9
144 3° F	5' CAAGACCAATCCGCTTTG 3'		52,1
144 3° R	5' CGCAATTTTCGTTAGTCAGAG 3'	625	51,9
144 4° F	5' GAAATTGACCTTGCTTGC 3'		49,6
144 4° R	5' GAAACAGGATTTACATCCG 3'	436	48,3
144 5° F	5' CAAACTTTACCAAACATGCC 3'		50,2
144 5° R	5' CTT CAGATTTTT CAGTACTTGG 3'	609	49,4
146 1° F	5' CTAGCAAGCTCTCAGAAG 3'		49,5
146 1° R	5' GACAAAAAGGTGCTAATC 3'	423	45,9
147 1° F	5' GCGGTGTAAAGATAATTGTAC 3'		49,1
147 1° R	5' GATAAGACAAGCGACTAAACC 3'	758	50,9
147 2° F	5' CCAGAAAAATCAACGAC 3'		45,6
147 2° R	5' CCGCTTATTTGTGATAC 3'	771	44,8
147 3° F	5' GGAATTTCCCAGTTTTTATG 3'		47,0
147 3° R	5' CTTGATTTGCCTCTAATTCTAG 3'	1362	48,8
147 4° F	5' GAATGGTACTTTTGAACGC 3'		49,4
147 4° R	5' CAAGATGGAGTTGTCCG 3'	375	50,0
149 1° F	5' GTCGGCTGTTGACATTC 3'		51,0
149 1° R	5' CCCTAACTGGTTGTATTCAG 3'	584	50,2
149 2° F	5' CATTATCCGATTCGAC 3'		43,5
149 2° R	5' CAAATTAGTAAACAGTGG 3'	621	42,7
150 1° F	5' GGAAAGCCAAAATTCAGG 3'		49,0
150 1° R	5' GCAAGTCTAATGCCATTC 3'	394	51,4

Continuação APÊNDICE A

151 1° F	5' GGCAGGACCGATGACTGG 3'		58,3
151 1° R	5' CGCAACGTATCTCGCTGC 3'	750	56,8
UT2 1° F	5' CAGCGTCTGCACATGCC 3'		57,4
UT2 1° R	5' CAATTCAGAAGGTCCAACG 3'	2094	53,7
UT2 2° F	5' GATTCGCAACTAGCCTAC 3'		50,2
UT2 2° R	5' CTCTCAAATTCTGACGATG 3'	1930	48,0
UT2 3° F	5' CTCAGGCAAAATTACACTTTATTC 3'		50,6
UT2 3° R	5' GATTAAATTCCATTGTGTCTTTG 3'	609	48,6
UT3 1° F	5' GTTCGTCAGGTTCTCCTC 3'		52,2
UT3 1° R	5' GAAGAGCACGTTACCTTG 3'	1245	53,8
UT3 2° F	5' GCCTTGCATGTGATTATAACG 3'		52,1
UT3 2° R	5' GCAAGTGTAACTCAACCAATAATG 3'	1114	52,6
UT3 3° F	5' CAATCGCATTAGGTGTTGC 3'		52,1
UT3 3° R	5' CAAAAGCAAAGCCTCCATG 3'	938	52,4
UT4 1° F	5' GATGTTCTCGTTCTTGTCTATG 3'		53,5
UT4 1° R	5' GCGAAACTGATTGATGGTAGTAG 3'	475	53,4
UT4 2° F	5' GCTCTTCTTATGTAATGGCG 3'		51,1
UT4 2° R	5' GTGAATCAGGATGATTTGC 3'	670	49,0
UT4 3° F	5' CGGAGCTTATGAATTAGGTC 3'		50,3
UT4 3° R	5' CGAGTAAAGAGCCTAATCC 3'	1415	49,6
gyr	5' CCTACCGCAATTCCTGAG 3'		52,7
deoC	5' GCCCATGAGCGATAG 3'	1338	52,6
gyr F	5' GCATCCAGACTCATAAGTCC 3'		52,5
gyr R	5' CGGCTAACCTCACTTGC 3'	941	53,4

APÊNDICE B: Unidades de transcrição de *M. hyopneumoniae* confirmadas experimentalmente.

Unidade de Transcrição	Região Intergênica * (pb)	Posição inicial	Posição final	Tamanho (pb)	Produto
UT 07				562	
MHP7448_0131 rplU	9	171734	172033	299	Proteína ribossomal 50S, L21
MHP7448_0132 rpmA		172042	172296	254	Proteína ribossomal 50S, L27
UT 10				9527	
MHP7448_0219	711	258914	259669	755	Proteína hipotética
MHP7448_0220	89	260380	260649	269	Proteína hipotética
MHP7448_0221 nrdE	76	260738	262879	2141	Ribonucleotídeo difosfato redutase sub.alfa
MHP7448_0222 nrdI	2	262955	263407	452	Ribonucleotídeo redutase proteína estimulatória
MHP7448_0223 nrdF	2757	263409	264428	1019	Ribonucleotídeo difosfato redutase sub.beta
MHP7448_0224 glyA		267185	268441	1256	Serina hidroximetiltransferase
UT 15				11675	
MHP7448_0256 dnaX	107	309987	312146	2159	DNA polimerase III subunidade gama
MHP7448_0257	3	312253	312498	245	Proteína hipotética
MHP7448_0258 recC	-3	312501	313085	584	RecR proteína de recombinação
MHP7448_0259 tmk	41	313082	313723	641	Timidilato quinase
MHP7448_0260	130	313764	314576	812	DNA polimerase III sub. delta'
MHP7448_0261	33	314706	315314	608	Proteína hipotética
MHP7448_0262 hpt	29	315347	315883	536	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
MHP7448_0263	-27	315912	316730	818	Transporte de cobalto,sub.ligadora de ATP
MHP7448_0264	-10	316703	317605	902	Transporte de cobalto,sub.ligadora de ATP
MHP7448_0265	1	317595	318557	962	ABC transporte proteína permease
MHP7448_0266 lig	70	318558	320639	2081	DNA ligase
MHP7448_0267		320709	321662	953	Proteína hipotética
UT 23				6688	
MHP7448_0299	1003	360345	361097	752	Proteína hipotética
MHP7448_0300	56	362100	363863	1763	Proteína hipotética
MHP7448_0301	135	363919	364482	563	Proteína hipotética
MHP7448_0302	-7	364617	366050	1433	Permease
MHP7448_0302 ugpQ	2	366043	366777	734	Glicerofosforil diéster fosfodiesterase
MHP7448_0304		366779	367033	254	Proteína hipotética

Continuação APÊNDICE B

UT 31					8562	
MHP7448_0338	8	418036	419295	1259	Proteína hipotética	
MHP7448_0339	1576	419303	420088	785	Proteína hipotética	
MHP7448_0340	-13	421664	424051	2387	ABC transporte- protein ligadora de ATP	
MHP7448_0341	36	424038	425894	1856	Proteína hipotética	
MHP7448_0342		425930	426598	668	Proteína hipotética	
UT 55					5622	
MHP7448_0513	121	680272	681531	1259	46K antígeno precursor de superfície	
MHP7448_0514 xylG	0	681652	683196	1544	Xilose ABC transporte-Proteína ligadora de ATP	
MHP7448_0515 xylH	5	683196	684446	1250	Xilose ABC transporte -Proteína permease	
MHP7448_0516	11	684451	685014	563	Proteína hipotética	
MHP7448_0517 glck		685025	685894	869	Glicoquinase	
UT 57					6360	
MHP7448_0523 tuf	299	697660	698868	1208	Fator de elongação	
MHP7448_0524 ion	165	699167	701785	2618	Protease ATP-dependente choque térmico	
MHP7448_0525	3	701950	702645	695	Proteína hipotética	
MHP7448_0526 upp	93	702648	703262	614	Uracil fosforibosiltransferase	
MHP7448_0527 deoC		703355	704020	665	Deoxiribose fosfato aldolase	
UT 60					5686	
MHP7448_0552 ulaA	16	737882	739396	1514	Sistema PTS- ascorbato específico, enzima IIC	
MHP7448_0553	-10	739412	739687	275	Sistema PTS- galactitol específico, enzima componente IIB	
MHP7448_0554		739677	740093	416	Sistema PTS, enzima componente IIA	
MHP7448_0555	5	740434	741090	656	Proteína hipotética	
MHP7448_0556	214	741095	741490	395	Proteína hipotética	
MHP7448_0557	516	741704	742360	656	Proteína hipotética	
MHP7448_0558		742876	743568	692	Proteína hipotética	
UT 61					3400	
MHP7448_0573 fba-1	9	761487	762308	821	Frutose-bifosfato aldolase	
MHP7448_0574	97	762317	764026	1709	Sistema PTS, N-acetilglicosamina-específica II ABC componente	
MHP7448_0575 nagB		764123	764887	764	Glicosamina-6-fosfato deaminase	
UT 62					1992	
MHP7448_0576 rpsD	114	765255	765872	617	Proteína ribossomal 30S, S4	
MHP7448_0577 rpiB	0	765986	766420	434	Ribose-5-fosfato isomerase B	
MHP7448_0578 fpg		766420	767247	3400	Formamidopirimidina-DNA glicosilase	
UT 63					9995	
MHP7448_0579	27	767360	768031	671	Proteína hipotética	

Continuação APÊNDICE B

MHP7448_0580 mnuA	22	768058	769191	1133	Lipoproteína – nuclease de membrana
MHP7448_0581	3	769213	770097	884	Exonuclease 5'-3'
MHP7448_0582 dnaE	26	770100	773069	2969	DNA polimerase III
MHP7448_0583 rbfA	12	773095	773424	329	Fator A- ligador ribossomal
MHP7448_0584 infB	-33	773436	775235	1799	IF-2- fator de iniciação da tradução
MHP7448_0585	10	775202	775492	290	Proteína hipotética
MHP7448_0586 nusA		775502	777355	1853	NusA- fator de alongação da transcrição
UT 70				16281	
MHP7448_0611	102	810129	812507	2378	Proteína hipotética
MHP7448_0612	268	812609	814699	2090	Proteína hipotética
MHP7448_0613	5	814967	815629	662	Proteína hipotética
MHP7448_0614 ddeM	131	815634	816815	1181	DNA metiltransferase citosina específica
MHP7448_0615	7	816946	817365	419	Proteína hipotética
MHP7448_0616 rpoC	57	817372	821610	4238	RNA polimerase subunidade beta'
MHP7448_0617 rpoB	207	821667	825329	3662	RNA polimerase subunidade beta
MHP7448_0618 rplL	12	825536	825901	365	Proteína ribossomal 50S, L7/L12
MHP7448_0619 rplJ		825913	826410	497	Proteína ribossomal 50S, L10
UT 76				11596	
MHP7448_0637 nusG	257	856879	857451	572	Proteína NusG- antiterminação da transcrição
MHP7448_0638 rpmG	51	857708	857848	140	Proteína ribossomal 50S, L33
MHP7448_0639	12	857899	858453	554	Proteína hipotética
MHP7448_0640	34	858465	859166	701	tRNA/rRNA metiltransferase
MHP7448_0641 cysS	-4	859200	860405	1205	Cisteinil-tRNA sintetase
MHP7448_0642	5	860401	861063	662	Proteína hipotética
MHP7448_0643	0	861068	862300	1232	Hemolisina C
MHP7448_0644 dnaB	-7	862300	863691	1391	DNA helicase replicativa
MHP7448_0645 rplI	-19	863684	864121	437	Proteína ribossomal 50S, L9
MHP7448_0646	4	864102	866099	1997	Proteína hipotética
MHP7448_0647 leuS		866103	868475	2372	Leucil-tRNA sintetase
UT 77				2864	
MHP7448_0648 uvrB	22	868683	870662	1979	Excinuclease ABC, subunidade B
MHP7448_0649		870684	871547	863	Proteína hipotética
UT 78				3147	
MHP7448_709	71	871588	871664	76	tRNA Ile
MHP7448_0650 rpsI	4	871735	872133	398	Proteína ribossomal 30S, S9
MHP7448_0651 rplM	142	872137	872571	434	Proteína ribossomal 50S, L13
MHP7448_0652 ksgA	8	872713	873465	752	Dimetiladenosina transferase
MHP7448_0653		873473	874735	1262	Proteína hipotética
UT 79				11450	
MHP7448_0654 prsA	23	874822	875808	986	Ribose-fosfato pirofosfoquinase
MHP7448_0655 gidB	134	875831	876439	608	Proteína B- divisão inibidora de glicose

Continuação APÊNDICE B

MHP7448_0656	199	876573	878456	1883	Prolipoproteína p65
MHP7448_0657	122	878655	881594	2939	ABC transporte, proteína P115- <i>like</i> -ligadora de ATP
MHP7448_0658 rpmG	2	881716	881868	152	Proteína ribossomal 50S L33
MHP7448_0659 pepP	36	881870	882907	1037	XAA-Pro aminopeptidase
MHP7448_0660	55	882943	884646	1703	Proteína hipotética
MHP7448_0661		884701	886272	1571	Proteína hipotética
UT 80				7650	
MHP7448_0662	134	886722	890258	3536	Proteína hipotética
MHP7448_0663		890392	894372	3980	Proteína P146- semelhante à adesina
UT 81				3205	
MHP7448_0664	-12	894932	896536	1604	ABC transporte Pr1 – ligadora de ATP
MHP7448_0665		896524	898137	1613	ABC transporte Pr2- <i>like</i> - ligadora de ATP
UT 82				8691	
MHP7448_0666	296	903367	903612	245	Proteína hipotética
MHP7448_0667	41	903908	904522	614	Proteína hipotética
MHP7448_0668 greA	69	904563	905045	482	Fator de elongação da transcrição
MHP7448_0669	81	905114	906607	1493	Proteína hipotética
MHP7448_0670	13	906688	907653	965	Proteína hipotética
MHP7448_0671	11	907666	909579	1913	Proteína hipotética
MHP7448_0672 valS		909590	912058	2468	Valil-tRNA sintetase
UT 83				6072	
MHP7448_0674	56	914007	915008	1001	Proteína hipotética
MHP7448_0675	79	915064	917682	2618	Proteína hipotética
MHP7448_0676	-10	917761	919590	1829	Proteína interna de membrana translocase, componente YidC-putativa
MHP7448_0677 mpA	18	919580	919918	338	Proteína ribonuclease componente P
MHP7448_0678 rpmH		919936	920079	143	Proteína ribossomal, 50S, L34
UT 92				4921	
MHP7448_0710	484	898439	901340	2901	23S ribossomal
MHP7448_0711		901824	903360	1536	16S ribossomal

* Número de pares de bases entre a ORF correspondente e a ORF posterior. Números negativos representam a sobreposição de bases. A nomenclatura das ORFs pertencentes a cada UT segue a referência do *GenBank*.

APÊNDICE C - ORFs transcritas em mRNA monocistrônico em *M. hyopneumoniae*.

ORF	Posição inicial	Posição final	Tamanho (pb)	Produto
MHP7448_0016	16714	17025	311	Proteína hipotética
MHP7448_0017	17360	18163	803	Proteína hipotética
MHP7448_0066 uvrC	85675	87192	1517	Exinuclease ABC subunidade C
MHP7448_0087 rbgA	111604	112422	818	GTPase ribossomal biogenese
MHP7448_0090	115455	116348	893	Proteína hipotética
MHP7448_0094	122700	124283	1583	Proteína hipotética
MHP7448_0095	124306	124893	587	Proteína hipotética
MHP7448_0101 clpB	134736	136829	2093	Protease proteína ligadora ATP-dependente
MHP7448_0119	162970	163413	443	Proteína hipotética
MHP7448_0128	169480	169773	293	Proteína hipotética
MHP7448_0133 lip2	172554	173351	797	lipase-esterase
MHP7448_0692	177735	177818	83	tRNA-Leu
MHP7448_0693	185763	185837	74	tRNA-Trp
MHP7448_0200	228290	228973	683	Proteína hipotética
MHP7448_0211	241747	242811	1064	Proteína hipotética
MHP7448_0232	277801	278124	323	Proteína hipotética
MHP7448_0268 mgtA	321659	324232	2573	Transporte cátion tipo P ATPase
MHP7448_0279	338452	339270	818	Regulador transcricional
MHP7448_0280 pyrG	339786	341390	1604	CTP sintetase
MHP7448_0308	373223	378964	5741	Proteína hipotética
MHP7448_0322	396233	396502	269	Transposase
MHP7448_0323	397045	398703	1658	Transposase
MHP7448_0336	415468	415929	461	Proteína hipotética
MHP7448_0337	416420	417217	797	Proteína hipotética
MHP7448_0343	427468	427608	140	Transposase degenerada
MHP7448_0344	428201	429214	1013	Proteína hipotética
MHP7448_0357	446273	447850	1577	Amino ácido permease
MHP7448_0390	490885	492264	1379	Proteína hipotética
MHP7448_0485	633299	634102	803	Proteína hipotética
MHP7448_0522	691545	697559	6014	Proteína hipotética
MHP7448_0528 gyrA	704416	707022	2606	DNA girase subunidade A
MHP7448_0545 ktrA	726591	727286	695	Proteína captadora de potássio
MHP7448_0546 ktrB	727584	729068	1484	Proteína captadora de potássio
MHP7448_0551	736778	737563	785	Proteína hipotética
MHP7448_0571 pdhD-1	758738	760102	1364	Dihidrolipoamida desidrogenase
MHP7448_0572 nagA	760272	761432	1160	N-acetylglucosamina-6-fosfatoe deacetilase
MHP7448_0587 pulA	777867	779873	2006	pullulanase
MHP7448_0622 dam	831858	833507	1649	DNA adenina metilase
MHP7448_0626	838137	840500	2363	Proteína hipotética
MHP7448_0635	853418	854336	918	O-sialoglicoproteína endopeptidase
MHP7448_0708	854470	854560	90	tRNA-Ser

CURRICULUM VITAE

MABONI, F.

Nome Franciele Maboni
Email franmaboni@gmail.com
Nascimento Frederico Westphalen/RS/Brasil. 02/04/1984

Formação Acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização de Unidades de Transcrição em *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Orientador: Irene Schrank

2003 - 2008 Graduação em Medicina Veterinária.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
Título: Clonagem e Expressão do Domínio 2 do Fator σ de *M. hyopneumoniae* em vetor pGEX 4T-3.
Orientador: Agueda Castagna de Vargas, Irene Silveira Schrank

Formação complementar

2008 - 2008 estágio curricular em Biologia molecular e celular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2007 - 2007 Campanha de Vacinação contra raiva em cães e gatos.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil.

2007 - 2007 Curso de curta duração: Ferramentas microbiologia aplicadas a indústria de alimentos.
Verus Madasa do Brasil, Porto Alegre, Brasil.

2007 - 2007 Curso de curta duração: Controle de qualidade na industria de alimentos.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração: Gestão da qualidade no laboratório de microbiologia.
Sociedade Brasileira de Microbiologia, SBM, São Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração: II Curso de técnicas aplicadas de biologia molecular.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração: Métodos Analíticos Para Identificação de OGMs.
Associação Nacional de Biossegurança, ANBIO, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração: Método de Detecção Qualitativa de Soja Transgênica.
Gehaka, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Mestrando, Bolsista DT/CNPq, Carga horária: 40hrs.

Atividades

2009 - atual Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia
- Seqüenciamento parcial do genoma do *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*.

- Organização das Unidades de Transcrição em *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Vínculo institucional

2003 - 2008 Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária: 20hrs
Laboratório de Bacteriologia- LABAC.

Atividades

2003 - 2008

Projetos de pesquisa:

- Filogenia de *Escherichia coli* isoladas de suínos da região sul do Brasil.
- Biossegurança em ambientes de trabalho na UFSM- avaliação de riscos e elaboração de mapas de riscos.
- PCR multiplex para detecção dos Genes *vap* em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens.
- LABAC- Determinação e diagnóstico de patógenos e produção de imunobiológicos
- PCR multiplex para detecção dos genes *vap* em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens.
- Laboratório de clonagem e expressão de proteínas e antígenos na região central do estado do Rio Grande do Sul.
- Imunodifusão em gel de ágar com antígeno recombinante *VapA* para a detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi*.
- Reação em cadeia da polimerase multiplex para caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Rhodococcus equi* do Brasil.
- Padronização e validação de métodos para a detecção de organismos geneticamente modificados (OGMs) em alimentos.
- Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidas em criatórios suínos da região sul do Brasil.
- Caracterização antigênica de proteínas de superfície (S- layer) de *Campylobacter fetus* isoladas de bovinos
- Análise de diferença representacional (RDA) entre genomas de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.
- LABAC- soluções biotecnológicas
- Treinamento de médicos veterinários para o diagnóstico de brucelose para atender a demanda do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose
- Levantamento sanitário do rebanho leiteiro pertencente ao convênio UFSM e COPROL.
- Caracterização molecular de isolados de *Streptococcus equi* através de

sequenciamento parcial do gene *hsp 60*.

- Comparação do efeito antimicrobiano, auxílio laboratorial à pequena propriedade.

- Pesquisa de *E.coli* verotoxigênicas em amostras provenientes de avaliação microbiológica de frigorífico do município de Santa Maria.

- Caracterização de superóxido dismutase em *Rhodococcus equi*, clonagem e expressão em *E. coli* do gene *vap* de *Rhodococcus equi*.

- Padronização da técnica de PCR para diagnóstico da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos.

04/2007 - 08/2007 Centro de Ciências Rurais/ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Especificação: Monitoria da disciplina: Doenças infecto contagiosas dos animais domésticos.

06/2003 - 08/2003 Vínculo: Estagiário, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/CCR

LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS- LAMIC.
540 hrs.

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MABONI, Franciele, CARDOSO, R. L., MACHADO, G., ALVES, Sydney Hartz, VARGAS, Agueda Castagna de.

Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology** (Amsterdam. Print), v.140, p.111 - 122, 2009.

2. MABONI, Franciele, Skorei, M.R, ROCHA, R. X., CECIM, M., VARGAS, Agueda Castagna de.

Mastite gangrenosa por *Clostridium perfringens*. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, p.20 - 23, 2009.

3. MONEGO, Fernanda, MABONI, Franciele, KREWER, Cristina da Costa, COSTA, Mateus Matiuuzzi da, LORETO, E., VARGAS, Agueda Castagna de.

Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the *vap* gene family. **Current Microbiology**, v.58, p.399 - 403, 2009.

4. COSTA, Mateus Matiuuzzi da, MABONI, Franciele, WEBER, Shana S, FERRONATO, A. I., SCHRANK, Irene, VARGAS, Agueda Castagna de.

Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e resistência aos antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico** (Impresso), v.76, p.509 - 516, 2009.

5. COSTA, Mateus Matiuuzzi da, MABONI, Franciele, DRESCHER, Guilherme, WEBER, Shana S, SCHRANK, Irene, VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A., VARGAS, Agueda Castagna de.

Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental *Escherichia coli* swine isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.1 - 5, 2009.

6. KREWER, Cristina da Costa, MABONI, Franciele, WITT, Niura Mazzini, VARGAS, Agueda Castagna de, ALVES, Sydney Hartz.

Transmissão de *Pasteurella multocida* para humanos através de mordida de gato. **Veterinária Notícias**, v.14, p.77 - 80, 2008.

7. COSTA, Mateus Matiuuzzi da, MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, DRESCHER,

Guilherme, WEBER, Shana S, SCHRANK, Irene, BOTTON, S. D., VAINSTEIN, M. H.
Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.111 - 113, 2008.

8. MONEGO, Fernanda, MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, ASSIS, Ronnie Antunes.
Diagnóstico de *Clostridium botulinum* tipo C em cão. **Veterinária Notícias**, v.12, p.79 - 81, 2006.

Artigos aceitos para publicação

1. ASSIS, Ronnie Antunes, MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, NASCIMENTO, Ricardo Aurélio Pinto, LOBATO, Francisco Carlos Faria.
Mionecroses clostridiais bovinas. **Arquivos do Instituto Biológico**, PRELO, 2010.

2. MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, COSTA, Mateus Matiuuzzi da, Dutra, I, VARGAS, Agueda Castagna de.
Ocorrência de botulismo em bovinos confinados no Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, PRELO, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MABONI, Franciele, ERHARDT, M. M., PEREZ, R. F., VELOSO, A., CARDOSO, R. L., MALLMANN, Carlos Augusto, VARGAS, Agueda Castagna de.
Análise microbiológica de águas no município de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., 2008, Porto Alegre.
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.41. p.253 – 253, 2008.

2. MABONI, Franciele, KREWER, Carina da Costa, COSTA, Mateus Matiuuzzi da, MONEGO, Fernanda, VARGAS, Agueda Castagna de
Caracterização molecular de *Rhodococcus equi* de potros pela PCR multiplex dos genes da família vap. In: 23º Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2008, Santa Maria.
Anais da 23º Jornada Acadêmica Integrada, 2008.

3. MABONI, Franciele, ERHARDT, M. M., VARGAS, Agueda Castagna de, MALLMANN, Carlos Augusto, ERHARDT, G.M, PEREZ, R. F., Sperb, C.L.
Proporção de cães e gatos identificada em Cachoeira do Sul/RS. In: XVIII IEA World Congress Of Epidemiology, 2008, Porto Alegre.
Anais do XVIII congresso mundial de epidemiologia, 2008.

4. SARAIVA, Diego., CARDOSO, Roselaura., MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, WITT, Niura Mazzini
Salmonella sp. em subprodutos de origem animal e vegetal de diferentes regiões. In: 23 ° Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2008, SANTA MARIA.
ANAIS DA 23 ° Jornada Acadêmica Integrada, 2008.

5. VARGAS, Agueda Castagna de, MABONI, Franciele, FARIAS, Luana D'ávila, Hermann, G.P, MACHADO, G., SCHMITT, L.
Serological response of vaccinated heifers with attenuated S19 *Brucella abortus* strain. In: Brucellosis 2008 international conference, 2008, London.
Poster abstracts of Brucellosis 2008 international conference, p. 97 – 97, 2008.

6. MABONI, Franciele, ERHARDT, M. M., ERHARDT, G.M, VARGAS, Agueda Castagna de, MALLMANN, Carlos Augusto
Serviço anti-rábico e o papel da sociedade frente a este problema. In: XVIII IEA World Congress Of Epidemiology, 2008, Porto Alegre.
Revista Brasileira de Epidemiologia, 2008.

7. FERNER, J., CARDOSO, R. L., MABONI, Franciele, KIRINUS, Jackeline Karsten, VARGAS, Agueda

Castagna de

Agentes causadores de mastite bovina identificados no período de 2004 a 2007 no laboratório de bacteriologia (LABAC) da UFSM. In: 22ª Jornada Acadêmica Integrada, 2007, Santa Maria.

Anais da 22ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2007.

8. KOLLING, Lillian, MABONI, Franciele, COSTA, Mateus MatiuZZi da, VARGAS, Agueda Castagna de
Caracterização patotípica de isolados de *E. coli* de suínos: presença de plasmídeos e perfil de resistência aos antimicrobianos. In: 13º congresso da ABRAVES, 2007, Florianópolis/SC.

Anais do 13º congresso da ABRAVES, 2007.

9. BOTTON, S. D., MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, VARGAS, Agueda Castagna de
Identificação de *Rhodococcus equi* VAP B em javalis (*sus scrofa scrofa*) - relato de caso. In: 13º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, Florianópolis.

Anais do 13º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007. v.01.

10. MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, VARGAS, Agueda Castagna de
Infecção pulmonar em javalis (*Sus Scrofa Scrofa*) causada por *Rhodococcus equi* Vap B In: 22ª Jornada Acadêmica Integrada, 2007, Santa Maria.

Anais 22ª Jornada Acadêmica Integrada, 2007.

11. GRESSLER, L. T., MABONI, Franciele, FERNER, J., VARGAS, Agueda Castagna de
Levantamento Sanitário de rebanho leiteiro pertencente ao convenio UFSM/COPROL. In: 22ª Jornada Acadêmica Integrada, 2007, Santa Maria.

Anais da 22ª Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2007.

12. GRESSLER, L. T., MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, KREWER, Carina da Costa, VARGAS, Agueda Castagna de
PCR multiplex para detecção dos genes vap em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens. In: 22ª Jornada Acadêmica Integrada, 2007, Santa Maria.

Anais da 22ª Jornada Acadêmica Integrada, 2007.

13. MABONI, Franciele, COSTA, Mateus MatiuZZi da, KOLLING, Lillian, VARGAS, Agueda Castagna de
Perfil de patotípica, resistência aos antimicrobianos e presença de plasmídeo em isolados de *Escherichia coli* obtidos de suínos In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.

14. MABONI, Franciele, KIRINUS, Jackeline Karsten, ZENI, D., VARGAS, Agueda Castagna de
Relato de caso: *Listeria monocytogenes* isolada de chinchilas In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.

15. WEBER, Shana S, MABONI, Franciele, COSTA, Mateus MatiuZZi da, SILVA, Mariana Sá e, DRESCHER, Guilherme, VARGAS, Agueda Castagna de, SCHRANK, Irene
Caracterização molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli*. In: 25ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro/ SP.

Divisão de biblioteca e documentação - ESALQ/USP, 2006.

16. MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, GROFF, Ana Cláudia Mello, KREWER, Cristina da Costa, MONEGO, Fernanda, SILVA, Mariana Sá e
Clostridioses diagnosticadas no laboratório de bacteriologia da UFSM entre os anos de 1987 a 2004. In: XX Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2006, Santa Maria/RS, 2006.

Anais da 20ª Jornada Acadêmica Integrada.

17. MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, KREWER, Cristina da Costa, FARIAS, Luana D'ávila, SILVA, Mariana Sá e
Relato de caso: diarreia hemorrágica bovina no rio grande do sul In: XX Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2006, Santa Maria/RS.

Anais da 20ª Jornada Acadêmica Integrada.

18. KIRINUS, Jackeline Karsten, MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, GOMES, Aline Diefenbach, GROFF, Ana Claudia Mello
Padronização da técnica de PCR para diagnóstico de infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos In: XIX Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2004, Santa Maria/RS.

Anais da 19ª Jornada Acadêmica Integrada.

19. MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, GROFF, Ana Claudia Mello, RODRIGUES, Daniele

Relato de caso: *Pasteurella multocida* em lesão por mordida de gato em humano In: XIX Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2004, Santa Maria/RS.

Anais da 19ª Jornada Acadêmica Integrada.

20. KOWALSKI, Claudia Hoffmann, MABONI, Franciele, MURMANN, Lisandra, FICK, Fabiane, COCCO, Roberta, DILKIN, Paulo, MALLMANN, Carlos Augusto

Incidência de zearalenona em sorgo. In: 5º Simpósio latino americano de ciência de alimentos, 2003, Campinas/SP.

21. MABONI, Franciele, MALLMANN, Carlos Augusto, KOWALSKI, Claudia Hoffmann, ARAUJO, Daiane Dal Forno, MURMANN, Lisandra, DILKIN, Paulo

Ocorrência de aflatoxinas em ameixas brasileiras durante o anos de 2002. In: XVIII Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2003, Santa Maria/RS.

Anais da 18ª Jornada Acadêmica Integrada.

22. KOWALSKI, Claudia Hoffmann, MABONI, Franciele, MURMANN, Lisandra, DILKIN, Paulo, COCCO, Roberta, FICK, Fabiane, MALLMANN, Carlos Augusto

Ocorrência de aflatoxinas em silagem destinada ao consumo animal. In: 5º simpósio latino americano de ciência de alimentos, 2003, Campinas/SP.

23. MURMANN, Lisandra, MALLMANN, Carlos Augusto, KOWALSKI, Claudia Hoffmann, MABONI, Franciele, DILKIN, Paulo, DILKIN, M.

Temperaturas em equipamentos de congelamento de alimentos em estabelecimentos da cidade de Santa Maria/RS In: XVIII Jornada Acadêmica Integrada, 2003, SANTA MARIA.

Anais da 18ª Jornada Acadêmica Integrada.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. MACHADO, G., MABONI, Franciele, CARDOSO, R. L., VARGAS, Agueda Castagna de
Atividade antimicrobiana do extrato de própolis frente a isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de otite canina In: 35º Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado/RS.

Anais do 35º Conbravet, 2008. p.ID:04.620.

2. COSTA, F. R. L., PEIXOTO, R. M., SA, M. C. A., MABONI, Franciele, KREWER, Cristina da Costa, COSTA, Mateus Matiuuzzi da.

Isolamento e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* obtidas de carne comercializada no município de petrolina, PE. In: 35º Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado/RS.

Anais do 35º Conbravet, 2008.

3. CARDOSO, R. L., MABONI, Franciele, ERHARDT, G.M, WITT, Niura Mazzini, VARGAS, Agueda Castagna de

Salmonella sp. em subprodutos de origem animal e vegetal de diferentes regiões do Brasil. In: 35º Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado/RS.

Anais do 35º Conbravet, 2008. p.ID:08.663.

4. KIRINUS, Jackeline Karsten, MEDEIROS, soraya, MABONI, Franciele, GUEDES, Diego Saraiva, WITT, Niura Mazzini, VARGAS, Agueda Castagna de

Aspectos microbiológicos da qualidade do leite "in natura" em diferentes tempos de fervura. In: 21º Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2006, Santa Maria.

21º Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2006.

5. KOLLING, Lílian, KREWER, Carina da Costa, MABONI, Franciele, WITT, Niura Mazzini, KREWER, Cristina da Costa, VARGAS, Agueda Castagna de

Caracterização de *Escherichia coli* isoladas em fêmeas suínas com infecções do trato urinário In: 21º Jornada acadêmica integrada da UFSM, 2006, SANTA MARIA.

21º Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006.

6. MABONI, Franciele, KIRINUS, Jackeline Karsten, WITT, Niura Mazzini, MARCHIORO, Silvana Beutinger, ROSA, Gisele Bertol, VARGAS, Agueda Castagna de

Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidas em criatórios suínos da região sul do Brasil. In: 21º Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006, Santa Maria.

21º Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006.

7. RÉ, Francine Cenzi de, KREWER, Cristina da Costa, MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, GUEDES, Diego Saraiva, VARGAS, Agueda Castagna de

Isolamento de *Chromobacterium violaceum* de leite bovino mastítico: relato de caso. In: 21º Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006, SANTA MARIA.

21º Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006.

8. MARCHIORO, Silvana Beutinger, MABONI, Franciele, KREWER, Cristina da Costa, ROSA, Gisele Bertol, VARGAS, Agueda Castagna de

Produção de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para utilização em imunodiagnóstico e vacinação. In: 21º JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA- UFSM, 2006, SANTA MARIA.

21ª Jornada Acadêmica Integrada- UFSM, 2006.

9. KREWER, Carina da Costa, MABONI, Franciele, WITT, Niura Mazzini, ALVES, Sydney Hartz, KREWER, Cristina da Costa, VARGAS, Agueda Castagna de

Transmissão de *Pasteurella multocida* para humanos através de mordida de gato in: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006, Gramado.

XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006. v.076.

10. COSTA, Mateus MatiuZZi da, MABONI, Franciele, WEBER, Shana S, KOLLING, Lílian, DRESCHER, Guilherme, VARGAS, Agueda Castagna de, SCHRANK, Irene

Resistência aos antimicrobianos e presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli*. In: XII Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas em Suínos, 2005, FORTALEZA/ CE.

XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. p.07 - 08

Apresentação de Trabalho

1. MABONI, Franciele, ERHARDT, M. M., PEREZ, R. F., VELOSO, A., CARDOSO, R. L., MALLMANN, Carlos Augusto, VARGAS, Agueda Castagna de

Análise microbiológica de águas no município de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho). Evento: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

2. MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, KREWER, Carina da Costa, GRESSLER, L. T., COSTA, Mateus MatiuZZi da, VARGAS, Agueda Castagna de

Caracterização molecular de *Rhodococcus equi* de potros pela PCR multiplex dos genes da família vap, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho). Evento: 23ª jornada acadêmica integrada da UFSM.

3. MABONI, Franciele, MONEGO, Fernanda, KREWER, Carina da Costa, COSTA, Mateus MatiuZZi da, VARGAS, Agueda Castagna de

Caracterização molecular de Rhodococcus equi de potros pela PCR multiplex dos genes da família vap, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho). Evento: 23 ° Jornada Academica Integrada da UFSM.

4. MABONI, Franciele, ERHARDT, G.M, ERHARDT, M. M., PEREZ, R. F., Sperb, C.L., VARGAS, Agueda Castagna de, MALLMANN, Carlos Augusto

Proporção de cães e gatos identificada em Cachoeira do Sul/RS, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho). Evento: XVIII IEA Wolrd Congress of Epidemiology.

5. MABONI, Franciele, ERHARDT, G.M, ERHARDT, M. M., MALLMANN, Carlos Augusto, VARGAS, Agueda Castagna de

Serviço anti-rábico e o papel da sociedade frente a este problema, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho). Evento: XVIII IEA Wolrd Congress Of Epidemiology.

6. MABONI, Franciele, KOLLING, LÍlian, COSTA, Mateus Matiuzzi da, VARGAS, Agueda Castagna de
Perfil de patotipia, resistência aos antimicrobianos e presença de plasmídeo em isolados de Escherichia coli obtidos de suínos, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho). Evento: 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia.

7. MABONI, Franciele, KIRINUS, Jackeline Karsten, VARGAS, Agueda Castagna de, ZENI, D.

Relato de Caso: Listeria monocytogenes Isolada de Chinchilas, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho). Evento: 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia.

8. MABONI, Franciele, KIRINUS, Jackeline Karsten, WITT, Niura Mazzini, MARCHIORO, Silvana Beutinger, ROSA, Gisele Bertol, VARGAS, Agueda Castagna de

Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de Escherichia coli obtidas em criatórios suínos na região sul do brasil., 2006. (Outra,Apresentação de Trabalho). Universidade Federal de Santa Maria

9. MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, GROFF, Ana Claudia Mello, KREWER, Cristina da Costa, MONEGO, Fernanda, SILVA, Mariana Sá e

Clostridioses diagnosticadas no laboratório de bacteriologia da UFSM entre os anos de 1987 a 2004., 2006. (Outra,Apresentação de Trabalho). Universidade Federal de Santa Maria

10. MABONI, Franciele, VARGAS, Agueda Castagna de, KREWER, Cristina da Costa, FARIAS, Luana D'ávila, SILVA, Mariana Sá e

Relato de caso: diarreia hemorrágica bovina no rio grande do sul., 2006. (Outra,Apresentação de Trabalho). Universidade Federal de Santa Maria

11. MABONI, Franciele, VARGAS, Aguega Castagna de, GROFF, Ana Cláudia Mello, RODRIGUES, Daniele

Relato de caso: Pasteurella multocida em lesão por mordida de gato em humano., 2004. (Outra,Apresentação de Trabalho). Universidade Federal de Santa Maria

12. MABONI, Franciele, MALLMANN, Carlos Augusto, KOWALSKI, Claudia Hoffmann, ARAUJO, Daiane Dal Forno, MURMANN, Lisandra, DILKIN, Paulo

Ocorrência de aflatoxinas em ameixas brasileiras durante o ano de 2002., 2003. (Outra,Apresentação de Trabalho). Universidade Federal de Santa Maria