

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

ASPECTOS DA VIRULÊNCIA E DA RELAÇÃO ENTRE
***Mycoplasma hyopneumoniae* E SEU HOSPEDEIRO**

Tese de Doutorado

Scheila Gabriele Mucha

Porto Alegre, setembro de 2018.

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

ASPECTOS DA VIRULÊNCIA E DA RELAÇÃO ENTRE
***Mycoplasma hyopneumoniae* E SEU HOSPEDEIRO**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Scheila Gabriele Mucha

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-orientadora: Dr^a Marie-France Sagot

Porto Alegre, setembro de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microrganismos Diazotróficos, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; no Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE – UMR5558), situado na Université Claude Bernard Lyon 1; e no laboratório UMR Mycoplasmoses des Ruminantes, situado em ANSES Laboratoire de Lyon.

Financiamento: CNPq, CAPES e Projeto CAPES-COFECUB 782/13.

“C’est le temps que tu a perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

Agradecimentos

Mais do que nunca, posso dizer que eu não fiz esse trabalho sozinha. A participação de diversas pessoas, academicamente ou não, fez com que esse trabalho fosse possível e chegasse ao fim. A todos esses eu só tenho a agradecer.

Primeiramente agradeço aos meus orientadores e idealizadores de tudo, **Arnaldo Zaha** e **Marie-France Sagot**, que me permitiram realizar esse trabalho incrível e me deram a oportunidade da minha vida de realizar parte dele na França. Vocês ajudaram a criar e embarcaram em nossas ideias, às vezes meio mirabolantes, que no final parece que funcionaram. A orientação de vocês foi essencial para formar meu pensamento crítico e ajudar a me tornar uma pesquisadora durante esses anos do doutorado. Obrigada por serem, além de pesquisadores e orientadores brilhantes, humanos e gentis, que sempre enxergaram a pessoa por trás da orientanda e além de uma relação profissional, desenvolveram também uma amizade.

Em seguida, não posso deixar de agradecer a melhor co-autora que a vida poderia me presentear, **Mariana Ferrarini**. Nossos pensamentos, ideias e ritmos de trabalho se complementam e eu não teria feito esse trabalho sem a sua participação. As longas discussões, trocas, planejamentos de experimentos, extrações de RNA até às 11h da noite, correções e infinitas versões de artigos foram essenciais para terminar essa tese. A melhor parte é que além de colega, você também se tornou minha amiga-irmã e uma das gratas surpresas que encontrei em Lyon. Parceria infinita pra apéros, girls night in, girls night out, ponte aérea PoA-Ctba, comer miojo durante a semana para ostentar em Nice no findi e o que mais a vida colocar na frente. Parte da melhor coloc que a França já viu, junto com a Susinha e o Loïc, que se tornaram parte da minha família longe de casa. Além da colaboração científica, tenho certeza que levarei sua amizade para a vida.

Também tenho que agradecer ao ANSES e à **Florence Tardy**, que nos permitiram trabalhar com os micoplasmas em Lyon, e que sempre deu toda a estrutura necessária e fez os contatos que nos permitiram seguir com o trabalho. Agradeço à equipe da virologia do ANSES, **Philippe Marianneau**, **Séverine Murri**, **Johann Vulin** e **Sandra Lacote**, que me abriram as portas para trabalhar com o cultivo de células. É imprescindível agradecer à **Sophie Rome**, que me ensinou o trabalho com os exossomos, deu sugestões importantes e me ajudou a fazer as perguntas certas. Um muito obrigada especial à **Carol Moraga** pelas análises de miRNAs. Agradeço também ao **Van Tran-Van** e à **Claire Valiente Moro**, do Grupo de Ecologie Microbienne da Universidade de Lyon que me permitiram usar a ultracentrífuga para a extração de exossomos.

Agradeço à professora **Irene Schrank**, que abriu as portas da vida científica para mim e me orientou até o mestrado. Além disso, me abrigou em seu laboratório até o final do doutorado. Também agradeço aos demais professores do PPGBCM pelos ensinamentos e motivações durante todos esses anos no Cbiot.

Os colegas e amigos de todos os laboratórios por onde passei são com certeza os melhores: **Fran, Mari, Laura B. Tiago F., Amanda, Gabi, Camila, Luana, Tiago C., Blerina, Laura U., Susinha, Carol, Alex, Alice, Ricardo, Martin, Gustavo, Taneli, Mattia, Leandro, Dima, Cristian, Camille, Delphine, Arnaud, Hélène, André, Laurent** e tantos outros que já cruzaram o meu caminho e que tive o prazer de conhecer. Obrigada a vocês pela companhia, pelas discussões – científicas ou não – (inclusive sobre como controlar baratas), pelos cafés, happy hours, noites, almoços, jantares e tantos outros programas. A amizade e compreensão de vocês foram indispensáveis durante essa jornada e uma das melhores partes da pós-graduação.

Não posso deixar de agradecer a todo o pessoal de apoio, que não colocou as mãos no trabalho diretamente, mas sem os quais nossas vidas não andariam. Agradeço ao pessoal da secretaria e de suporte no Brasil e também na França: **Silvia Centeno, Luciano Saucedo, Florence Bouheddi, Marina da Graça, Hélène Henri e Nelly Burlet**. O trabalho de vocês fica nos bastidores, mas com certeza é essencial para resolver a burocracia e permitir que nossas atividades possam fluir.

Saindo do mundo da pesquisa, agradeço ao **Igor**, que sempre entendeu meu tempo durante a dissertação da tese e sabia que quando eu não falava sobre esse assunto não deveria perguntar, mas que olhava com admiração quando eu me empolgava com algum resultado. Obrigada por estar ao meu lado durante todo esse tempo fazendo meus dias mais felizes, sempre me apoiando, me incentivando e confortando. Um dia quero ser tão grande quanto os teus olhos me veem. Te amo!

Finalmente, agradeço à minha família, minha irmã **Pâmela** e principalmente aos meus pais, **Ingrid e Neri**. A vocês vai o meu agradecimento principal, pois sempre me incentivaram e nunca deixaram de me apoiar incondicionalmente, mesmo quando o doutorado levou mais tempo que o esperado e tive que voltar a contar com seu apoio financeiro. Obrigada por sempre me incentivarem a buscar o meu melhor, a buscar as melhores oportunidades, mesmo que isso significasse termos que ficar mais longe. Obrigada por me criarem para o mundo e me ensinarem a voar. Obrigada pela confiança, pelo conforto e por sempre acreditarem em mim. Amo muito vocês!

Essa conquista não é só minha, cada um de vocês é responsável por uma parte dela. Muito obrigada!

ÍNDICE

Abreviaturas, símbolos e unidades	IX
Lista de figuras	XI
Lista de tabelas	XI
Resumo	XII
Abstract	XIII
1. Introdução	14
1.1 Micoplasmoses do trato respiratório suíno	14
1.2 O Gênero <i>Mycoplasma</i>	17
1.3 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	20
1.4 <i>Mycoplasma flocculare</i>	22
1.5 <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	24
1.6 Patogenicidade dos micoplasmas	26
1.7 Patogenicidade de <i>M. hyopneumoniae</i>	31
1.8 Exossomos	37
1.9 miRNAs	41
1.10 Interações patógeno-hospedeiro mediadas por miRNAs	46
2. Justificativa	48
3. Objetivos	49
3.1 Objetivos gerais	49
3.2 Objetivos específicos	49
4. Resultados	50
4.1 Capítulo 1: Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	51
4.2 Capítulo 2: <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells.	66

4.3 Capítulo 3: Avaliação do efeito de exossomos no cultivo de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	94
4.3.1 Materiais e Métodos	94
4.3.2 Resultados e Discussão	98
5. Discussão Geral	102
6. Conclusões	136
7. Perspectivas	138
8. Referências Bibliográficas	139
9. Anexos	169
9.1 Material suplementar referente ao artigo: <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells.	169
9.2 Identificação de sequências referentes ao elemento de resposta antioxidante (ARE) na região promotora de genes putativos regulados por NRF2.	173
9.3 Composição dos meios definidos usados para o crescimento de micoplasmas suínos.	178
9.4 Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling	180
10. Curriculum vitae	201

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
A	adenina
ARE	elemento de resposta antioxidante (<i>antioxidant response element</i>)
ATP	trifosfato de adenosina
C	citossina
CCU	<i>color changing units</i>
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
DHAP	di-hidroxiacetona fosfato
Fba	frutose-1-6-bisfosfato aldolase
FC	<i>fold change</i>
FBS	soro fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
G	guanina
<i>g</i>	gravidade
GFP	proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent protein</i>)
glpO	glicerol 3-fosfato oxidase
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GTP	trifosfato de guanosina
IFN	interferon
IL	interleucina
IolJ	6-fosfo-5-desidro-2-desoxi-D-gluconato aldolase
kb	quilobase (1.000 pares de bases)
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µm	micromolar
LPS	lipopolissacarídeo

mB	megabase (1.000.000 pares de bases)
mL	mililitro
mM	milimolar
MAPK	proteína quinases ativadas por mitógenos (<i>Mitogen activated Protein Kinases</i>)
min	minuto
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	fator nuclear kappa B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
NGS	sequenciamento de nova geração (<i>new generation sequencing</i>)
nM	nanômetro
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PES	pneumonia enzoótica suína
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
sRNA	pequeno RNA (<i>small RNA</i>)
tRNA	RNA transportador
rpm	revoluções por minuto
T	timina
TNF	fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
UTR	região não-traduzida (<i>untranslated region</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletromicrografia de células epiteliais suínas infectadas com <i>M. hyopneumoniae</i> .	15
Figura 2. Eletromicrografia de células epiteliais suínas infectadas com <i>M. flocculare</i> .	23
Figura 3. Colônias de <i>M. hyorhinis</i> em meio sólido.	25
Figura 4. Metabolismo diferencial de glicerol em <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. flocculare</i> e <i>M. hyorhinis</i> .	36
Figura 5. Biogênese e liberação de vesículas extracelulares.	38
Figura 6. Biogênese e maturação dos miRNAs.	42
Figura 7. <i>Western blot</i> contra a proteína GFP.	101
Figura 8. Diagrama esquemático representando as enzimas antioxidantes reguladas por NRF2.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais proteínas conhecidas relacionadas à adesão em <i>M. hyopneumoniae</i> .	33
Tabela 2. Contagem de células de <i>M. hyopneumoniae</i> cultivadas em diferentes tempos nos meios Yus+ e Friis.	99
Tabela 3. Genes regulados por NRF2 que apresentaram diferença de expressão durante a infecção de células NPTr por <i>M. hyopneumoniae</i> .	114
Tabela 4. Genes superexpressos regulados por NRF2 que são alvos de miRNAs <i>down-regulated</i> durante a infecção com <i>M. hyopneumoniae</i> .	130

RESUMO

O trato respiratório suíno é habitado por diversas espécies bacterianas. Dentre essas, os micoplasmas atraem particular interesse. São três as principais espécies de *Mycoplasma* encontradas nesse ambiente: *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente da pneumonia enzoótica suína, *Mycoplasma hyorhinis*, associado ao complexo de pneumonias suínas e causador de artrites, e *Mycoplasma flocculare*, considerada uma espécie comensal. A reconstrução das vias metabólicas dessas espécies identificou diferenças que podem estar relacionadas aos diferentes níveis de patogenicidade entre elas. Um aspecto interessante está relacionado ao metabolismo de glicerol e à consequente produção de peróxido de hidrogênio nas espécies patogênicas. Outra diferença importante é uma via para a captação e metabolismo de mio-inositol presente somente em *M. hyopneumoniae*. Enquanto todas as linhagens de *M. hyopneumoniae* foram capazes de captar mio-inositol do meio de cultura e permanecer viáveis após o cultivo com esse carboidrato como fonte primária de energia, a produção de peróxido de hidrogênio só foi detectada nas linhagens patogênicas dessa espécie em condições padrão de cultivo. Esses dois aspectos metabólicos de *M. hyopneumoniae* (produção de peróxido de hidrogênio e catabolismo de mio-inositol) podem estar diretamente relacionados a sua virulência aumentada em relação a *M. hyorhinis* e *M. flocculare*. Dessa forma, torna-se interessante estudar a interação de *M. hyopneumoniae* com o hospedeiro suíno. Assim, foi realizada a análise de expressão diferencial de genes e miRNAs de uma linhagem de células epiteliais suínas (NPTr) infectada por *M. hyopneumoniae* para identificar as alterações que a infecção causa na expressão gênica das células hospedeiras. Também foi analisada a expressão diferencial de miRNAs do meio extracelular e de exossomos liberados das células infectadas. A infecção levou à alteração da expressão de 1.283 genes e 170 miRNAs ($p < 0,05$). Diversos genes relacionados à atividade de oxidação-redução apresentaram aumento de expressão durante a infecção, em sua maioria regulados pelo fator de transcrição NRF2. NRF2 regula a expressão de genes citoprotetores em resposta ao estresse oxidativo. A produção de peróxido de hidrogênio por *M. hyopneumoniae* durante a infecção pode ter levado à ativação desse fator de transcrição, resultando no aumento da expressão de diversos genes com função antioxidante. Além disso, ocorreu a redução da expressão de miRNAs que regulam genes antioxidantes, de forma que parece haver uma alteração global na expressão gênica para ativar essa função durante a infecção. Genes relacionados aos cílios, ao citoesqueleto e à divisão celular apresentaram redução de expressão durante a infecção. O citoesqueleto e o ciclo celular são impactados por diversos patógenos e a infecção por *M. hyopneumoniae* pode estar relacionada a esses aspectos. Quanto aos cílios, houve a redução da expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pelo movimento ciliar, o que pode estar relacionado com a ciliostase induzida por *M. hyopneumoniae*. A maior parte dos miRNAs diferencialmente expressos identificados está nas amostras extracelulares e de exossomos, reforçando o papel dessas vesículas na comunicação celular. Devido à participação dos exossomos durante a infecção, testamos seu efeito sobre *M. hyopneumoniae* em cultura. No entanto, os resultados indicam que não ocorreu interação das vesículas com os micoplasmas e que os exossomos não alteraram o crescimento bacteriano.

ABSTRACT

Several bacterial species inhabit the swine respiratory tract. Among these, mycoplasmas attract particular interest. Three *Mycoplasma* species are important in this environment: *Mycoplasma hyopneumoniae*, agent of swine enzootic pneumonia, *Mycoplasma hyorhinis*, which is associated with pneumonia and causes arthritis, and *Mycoplasma flocculare*, considered a commensal species. The reconstruction of metabolic models of these species identified differences that might explain their different levels of pathogenicity. One important trait is related to glycerol metabolism and consequent hydrogen peroxide production in the pathogenic species. Another important feature is a pathway for uptake and metabolism of myo-inositol found only in *M. hyopneumoniae*. While all strains of *M. hyopneumoniae* were able to uptake myo-inositol from the culture medium and remain viable when this carbohydrate was the primary energy source, the hydrogen peroxide production was detected only in the pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* in rich medium. These two metabolic features of *M. hyopneumoniae* (hydrogen peroxide production and myo-inositol catabolism) might be directly related to its enhanced virulence compared to *M. hyorhinis* and *M. flocculare*. In this way, it is interesting to study the relation between *M. hyopneumoniae* and the swine host. Therefore, we analyzed the differential expression of genes and miRNAs of an epithelial porcine cell line (NPT_r) infected with *M. hyopneumoniae* to identify the changes that the infection caused in gene expression of host cells. We also analyzed the differential expression of miRNAs of the extracellular medium and of exosomes released from infected cells. The infection induced the differential expression of 1,283 genes and 170 miRNAs ($p < 0.05$). Several genes related to oxidation-reduction activity were up-regulated during infection; most of them are regulated by the transcription factor NRF2. NRF2 regulates the expression of cytoprotective genes in response to oxidative stress. Hydrogen peroxide production by *M. hyopneumoniae* during infection might have induced the activation of this transcription factor, resulting in increased expression of several antioxidant genes. In addition, we identified a down-regulation of miRNAs targeting antioxidant genes, so that it seems there is a global change in gene expression to activate this function during infection. Genes related to cilia, cytoskeleton and cell division were down-regulated during infection. The cytoskeleton and the cell cycle are affected by several pathogens and *M. hyopneumoniae* infection might be related to these aspects. Regarding the cilia, a number of genes that encode proteins responsible for the ciliary beating was down-regulated, which might be related to *M. hyopneumoniae* induced ciliostasis. Most of the miRNAs identified were differentially expressed in total extracellular and in exosome samples, reinforcing the role of these vesicles in cell communication. Due to the involvement of exosomes during infection, we tested their effect on *M. hyopneumoniae* in culture. However, we were not able to detect interactions between exosomes and mycoplasmas, and the vesicles did not affect bacterial growth.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Micoplasmoses do trato respiratório suíno

A suinocultura é uma atividade econômica de grande importância no Brasil, estando presente na maior parte das propriedades rurais brasileiras. O país é o quarto maior produtor mundial e quarto maior exportador de carne suína, com uma produção de 3.758 milhões de toneladas no ano de 2017, sendo a região Sul responsável por quase 65% do abate dos animais (ABPA, 2018). Atualmente a suinocultura é caracterizada por sistemas de produção intensiva, visando maior produtividade e diminuição dos custos associados à produção. No entanto, essa forma de produção leva a altas densidades populacionais em ambientes fechados, o que propicia maior exposição a agentes infecciosos. Diversas bactérias colonizam o trato respiratório suíno causando doenças, e dentre as enfermidades bacterianas de maior importância à suinocultura, destacamos as micoplasmoses.

A pneumonia enzoótica suína (PES) é a principal micoplasmose suína e a doença bacteriana que causa as maiores perdas econômicas na suinocultura (MAES *et al.*, 1996). A PES é uma doença respiratória infecciosa crônica que tem como principal agente etiológico a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*. *M. hyopneumoniae* é um patógeno extracelular que coloniza o trato respiratório através da aderência às células do epitélio ciliar de traquéia, brônquios e bronquíolos, causando danos a esses tecidos (DEBEY & ROSS, 1994). A aderência aos cílios é essencial para a iniciação da infecção, e uma vez estabelecida, ela induz ciliostase, perda dos cílios e morte das células epiteliais (Figura 1). Isso resulta em uma função diminuída do principal mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório, o aparelho mucociliar (DEBEY & ROSS, 1994; THACKER, 2004), o que predispõe o animal a infecções por patógenos secundários (CIPRIAN *et al.*, 1988; MAES *et al.*, 1996; THACKER, 2004). Além do impacto físico do microrganismo no trato respiratório, *M. hyopneumoniae* também é capaz de modular e evadir a resposta imune para persistir no hospedeiro (THACKER, 2004; MAES *et al.*, 2017).

A PES apresenta distribuição mundial, estando presente em quase todos os rebanhos suínos (MINION *et al.*, 2004). Caracteriza-se por uma tosse seca não-produtiva, retardo de crescimento, alta morbidade e baixa mortalidade (MAES *et al.*, 1996). A tosse é uma consequência direta das lesões pulmonares observadas nos animais afetados, que

consistem em áreas de consolidação púrpura acinzentadas (MAES *et al.*, 2017). A transmissão da enfermidade ocorre principalmente por transferência horizontal de suínos infectados para não-infectados, também ocorrendo transmissão vertical de fêmeas contaminadas para sua prole durante a lactação (NATHUES *et al.*, 2016). O impacto econômico da PES se dá sobretudo devido aos custos de tratamento e vacinação, às perdas relacionadas à redução no ganho de peso dos animais e conseqüente menores valores de venda de carcaças, e ao aumento da mortalidade causado pelas infecções secundárias (THACKER & MINION, 2012; MAES *et al.*, 2017).

O controle da PES pode ser realizado pelo uso de antibióticos, pela vacinação e pela otimização das práticas de manejo. Tetraciclina e macrolídeos são os antibióticos mais frequentemente utilizados no controle da PES (MAES *et al.*, 2008). No entanto, a utilização de medicamentos para o controle de infecções por *M. hyopneumoniae* muitas vezes oferece uma proteção apenas parcial e assim que o tratamento é interrompido a doença é novamente estabelecida (THACKER & MINION, 2012). Quanto às vacinas, as atualmente disponíveis são compostas pelo microrganismo inativado (bacterinas), mas elas conferem apenas proteção parcial ao rebanho e ainda não foi desenvolvida uma vacina completamente eficaz contra a bactéria (SIMIONATTO *et al.*, 2013; MAES *et al.*, 2017). Até o momento, um único método ainda não foi capaz de eliminar a infecção de forma rápida e eficiente. Dessa forma, fica evidente a necessidade de estudos que investiguem o metabolismo e os mecanismos moleculares de *M. hyopneumoniae* a fim de identificar novos potenciais alvos para o controle da infecção.

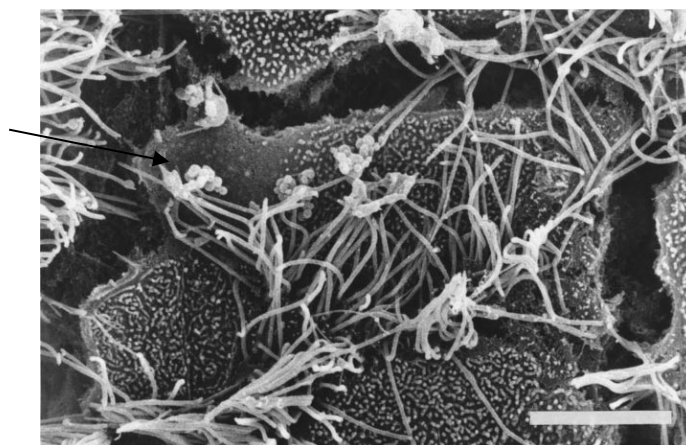


Figura 1. Eletromicrografia de células epiteliais suínas infectadas com *M. hyopneumoniae*. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a aderência e dano ao epitélio ciliado causado pela linhagem patogênica 91-3 de *M. hyopneumoniae* (seta). Escala: 5µm. Adaptado de Young *et al.* (2000).

Mycoplasma hyorhinis é outra espécie de *Mycoplasma* frequentemente isolada de suínos (KOBISCH & FRIIS, 1996). De acordo com Friis e Feenstra (1994), seu habitat natural são as membranas mucosas do trato respiratório superior e tonsilas. Após a exposição, o organismo se espalha rapidamente através do trato respiratório superior e pode ser frequentemente isolado dos pulmões (THACKER & MINION, 2012), fazendo assim com que *M. hyorhinis* seja considerado agente etiológico do complexo de pneumonias suínas (GOIS *et al.*, 1968; GOIS *et al.*, 1971; KOBISCH & FRIIS, 1996). Adicionalmente, a pneumonia causada por *M. hyorhinis* está com frequência associada à infecção por *M. hyopneumoniae* (LIN *et al.*, 2006).

Assim como *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* se adere ao epitélio ciliado das vias aéreas dos suínos, prejudicando o aparelho mucociliar e predispondo o hospedeiro a infecções secundárias (THACKER & MINION, 2012). *M. hyorhinis* também já foi relacionado à ocorrência de otite média em suínos (MORITA *et al.*, 1995). Entretanto, apesar de o habitat natural dessa bactéria ser o trato respiratório suíno, a maioria das doenças associadas a *M. hyorhinis* estão relacionadas à invasão sistêmica do organismo, resultando em artrites e polisserosites (HAKKARAINEN *et al.*, 1992; THACKER & MINION, 2012). Além disso, este microrganismo ocupa um importante nicho artificial como um dos contaminantes de cultura celular mais prevalentes em todo o mundo (CITTI *et al.*, 2000).

Mycoplasma flocculare é a terceira espécie do gênero *Mycoplasma* encontrada colonizando o trato respiratório suíno. No entanto, apesar da alta prevalência em rebanhos, é considerada uma bactéria comensal e nenhuma doença foi relacionada a sua presença até o momento (KOBISCH & FRIIS, 1996).

Além das bactérias citadas, outras espécies de micoplasmas são encontradas colonizando diversos tecidos de suínos. Algumas delas são causadoras de doenças, como *Mycoplasma suis*, causadora de anemia, e *Mycoplasma hyosynoviae*, causadora de artrite em animais em fase de terminação. Outras espécies, como *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma hyopharyngis* e diversas espécies de *Acholeplasma* também podem ser isoladas de suínos, mas estas parecem ser não-patogênicas (THACKER & MINION, 2012).

1.2 – O gênero *Mycoplasma*

Os organismos do gênero *Mycoplasma* estão entre os menores e mais simples organismos auto-replicativos identificados. Pertencem à classe Mollicutes (do Latim: mollis, mole; cutis, pele), sendo que a ausência de parede celular e o tamanho diminuto são características que os diferenciam fenotipicamente dos demais procariotos (RAZIN, 2006). Inicialmente considerados vírus, os Mollicutes foram identificados como bactérias em meados da década de 1960. Desde então, o número de espécies pertencentes à classe vem crescendo e atualmente existem cerca de 200 bactérias caracterizadas como Mollicutes (RAZIN & HAYFLIK, 2010).

Os micoplasmas estão amplamente difundidos pela natureza como parasitos de seres humanos, mamíferos, aves, répteis, peixes, artrópodes e plantas (PITCHER & NICHOLAS, 2005). Normalmente são extracelulares, aderindo-se à superfície 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 fazer parte da microbiota natural do hospedeiro (RAZIN, 2006). Embora a maioria dos micoplasmas seja hospedeiro-específico, algumas espécies como *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* têm uma gama mais ampla de hospedeiros e a ocorrência de micoplasmas como agentes zoonóticos já foi ocasionalmente descrita (PITCHER & NICHOLAS, 2005; CITTI & BLANCHARD, 2013). Nos seres humanos, os micoplasmas estão relacionados a doenças, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, tais como síndromes respiratórias, pneumonia, artrite reumatoide e doenças autoimunes (BASEMAN & TULLY, 1997).

A ausência de parede celular explica algumas das propriedades únicas dos micoplasmas, como sensibilidade ao choque osmótico e detergentes, resistência à penicilina e formação de colônias com a forma peculiar de “ovo frito”. A existência de apenas uma membrana trilaminar simples faz com que morfologicamente os micoplasmas sejam considerados gram-negativos (RAZIN, 2006). Entretanto, filogeneticamente relacionam-se com bactérias gram-positivas, compartilhando um ancestral comum com os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium* (WOLF *et al.*, 2004). Acredita-se que a evolução dos Mollicutes teria ocorrido por degeneração ou redução do genoma de bactérias gram-positivas com baixo conteúdo de G+C, acompanhado de perdas significativas de sequências genômicas (WOESE, 1987). O caminho evolutivo da redução

do genoma levou os micoplasmas a um estilo de vida parasítico obrigatório, que presumivelmente selecionou as bactérias que melhor manipulam seus hospedeiros e fazem o melhor uso de seu nicho específico com um conjunto mínimo de genes (KAMMINGA *et al.*, 2017).

Os genomas dos organismos do gênero *Mycoplasma* são extremamente reduzidos, variando entre 564 kb (*Mycoplasma parvum*) e 1358 kb (*Mycoplasma penetrans*) (SASAKI *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2013) e apresentando um baixo conteúdo de G+C, com variações entre 22 e 40% (dados do *site* do NCBI – acesso em outubro de 2018). Assim como ocorre em outros organismos, a distribuição do conteúdo de G+C nos genomas de *Mycoplasma* é desigual. Nas regiões intergênicas o conteúdo de A+T é maior que nas regiões codificadoras, podendo chegar à ordem de 90% (DYBVIK & VOELKER, 1996). Também entre os genes a distribuição de nucleotídeos é irregular, sendo que o conteúdo de G+C concentra-se mais nos genes codificadores de rRNA e tRNA (RAZIN *et al.*, 1998). Como resultado da composição atípica dos genomas, há o favorecimento da utilização de códons que contêm adenina e timina (DYBVIK & VOELKER, 1996). Outra particularidade ligada a essa questão é a utilização do códon UGA para codificar triptofano (YAMAOKA *et al.*, 1985), característica também encontrada no genoma das mitocôndrias (MACINO *et al.*, 1979). Como no código genético universal, esse códon codifica um sinal de término de tradução, a expressão heteróloga de genes de *Mycoplasma* spp. pode ser comprometida, sendo necessárias metodologias de mutagênese dirigida (ROBINO *et al.*, 2005; HAMES *et al.*, 2005).

A economia de informação genética foi provavelmente a responsável pela perda, nos micoplasmas, de várias vias enzimáticas características da maioria das bactérias, impedindo a presença de uma vasta gama de atividades metabólicas. A maioria das atividades metabólicas existentes parece estar associada com a geração de energia, em vez de fornecer substratos para as vias de rotas de biossíntese (RAZIN & HAYFLIK, 2010). Conseqüentemente, esses organismos possuem complexas necessidades nutricionais, como a dependência de fontes externas de precursores biossintéticos, incluindo aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos e esteróis (BASEMAN & TULLY, 1997). Dessa forma, é necessário um contato íntimo entre os micoplasmas e as células do hospedeiro *in vivo* para que a bactéria seja capaz de suprir as necessidades nutricionais indispensáveis para sua

sobrevivência (CLARK, 2005). *In vitro*, esses organismos se multiplicam lentamente após a incubação em meios de cultura nutricionalmente complexos (RAZIN, 2006).

Assim como observado para as vias do metabolismo central, apenas os sistemas regulatórios considerados indispensáveis para a sobrevivência no ambiente natural foram mantidos durante a redução evolutiva dos micoplasmas (HALBEDEL & STULKE, 2007). O número de genes identificados relacionados à transcrição nos micoplasmas é significativamente menor que nas demais bactérias. Na linhagem 232 de *M. hyopneumoniae* são 11 genes e em *M. penetrans* são 23, correspondendo, respectivamente, a 1,6% e 2,2% do total de sequências de DNA codificadoras (SASAKI *et al.*, 2002; MINION *et al.*, 2004), enquanto que em bactérias como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* 6,7% e 8,4% das sequências codificadoras são responsáveis pela transcrição, respectivamente (SASAKI *et al.*, 2002; STOVER *et al.*, 2000). Além disso, apenas um fator sigma da RNA-polimerase foi identificado nos micoplasmas (RAZIN *et al.*, 1998). No entanto, apesar da aparente reduzida maquinaria de regulação gênica, tanto estresse ambiental quanto metabólico parecem induzir respostas transcricionais específicas nos micoplasmas (WEINER III, *et al.*, 2003; MUSATOVOVA *et al.*, 2006; GÜELL *et al.*, 2009; ZHANG & BASEMAN, 2011). Apesar da presença de poucos fatores de transcrição, parece haver uma complexa regulação nessas bactérias indicando que outros processos regulatórios podem estar envolvidos, como a regulação por RNAs não-codificadores (LLUCH-SENAR *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2016). É importante salientar que existe um grande número de proteínas hipotéticas sem função conhecida distribuídas ao longo do genoma de diversas espécies do gênero *Mycoplasma*, podendo, portanto, haver diversos genes relacionados ao controle da regulação gênica ainda não identificados.

A perda significativa de sequências genéticas aliada ao seu reduzido genoma faz dos micoplasmas um objeto de investigação adequado para a determinação do conjunto mínimo de genes necessários para o estabelecimento de vida independente (HUTCHISON *et al.*, 1999; GLASS *et al.*, 2006), além de levar a tentativas de criar uma célula artificial baseada no paradigma de que *M. genitalium* perdeu a maioria dos genes não-essenciais (GIBSON *et al.*, 2008; GIBSON *et al.*, 2010; HUTCHISON *et al.*, 2016). Aliado a sua importância médica e veterinária, isso faz com que diversas espécies de micoplasmas tenham seus genomas sequenciados. No momento, o NCBI (*National Center for*

Biotechnology Information) possui dados de 89 espécies do gênero *Mycoplasma* com o genoma total ou parcialmente sequenciado (acesso em outubro de 2018).

1.3 – *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína. Seu primeiro isolamento pulmonar foi relatado por Maré e Switzer (1965) nos Estados Unidos e por Goodwing *et al.* (1965) no Reino Unido a partir de suínos com sintomas de pneumonia. Assim como a maioria dos membros do gênero *Mycoplasma*, *M. hyopneumoniae* infecta apenas um único hospedeiro, o suíno, no entanto os mecanismos de especificidade pelo hospedeiro ainda são desconhecidos (MINION *et al.*, 2004).

O cultivo e isolamento de *M. hyopneumoniae* é complexo. Seu isolamento apresenta várias dificuldades devido a sua natureza fastidiosa, o crescimento lento e a presença de outros micoplasmas no trato respiratório suíno (MAES *et al.*, 2008). Como já mencionado, *M. hyorhinis* e *M. flocculare* são encontrados no mesmo ambiente que *M. hyopneumoniae* e apresentam grande semelhança com este último no que diz respeito à morfologia, ao crescimento e à antigenicidade (ROSS, 1999). Além disso, existe uma dificuldade de cultivo que é geral para os micoplasmas, sendo que muitas espécies nunca foram cultivadas (RAZIN *et al.*, 1998). *M. hyopneumoniae* é uma das espécies que apresentam método de cultivo estabelecido. O meio Friis, desenvolvido para isolamento de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, é um meio rico e possui soro suíno livre de anticorpos e o indicador de pH vermelho fenol (FRIIS, 1975). O crescimento bacteriano é controlado pela mudança de coloração do meio de cultivo de vermelho para amarelo, indicando a oxidação da glicose e a acidificação do meio. Inoculação em meio sólido e incubação na presença de 5-10% de dióxido de carbono resultam no aparecimento de colônias quase invisíveis após dois ou três dias de incubação (THACKER & MINION, 2012).

Baseados na reconstrução *in silico* das vias metabólicas de micoplasmas do trato respiratório suíno, Ferrarini e colaboradores (2016) desenvolveram um meio definido para o cultivo de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*. O meio, baseado no meio definido estabelecido para cultivo de *Mycoplasma pneumoniae* (YUS *et al.*, 2009), não permite a multiplicação bacteriana, mas permite que as células se mantenham viáveis mesmo após vários dias de cultivo (FERRARINI *et al.*, 2016). Apesar de ser somente um

meio de manutenção, este se torna um objeto interessante para o estudo de *M. hyopneumoniae*, pois é uma ferramenta manipulável que permite avaliar o impacto de diversos substratos no metabolismo da bactéria.

As linhagens de *M. hyopneumoniae* são antigênica e geneticamente diversas (THACKER & MINION, 2012). A diversidade genética foi confirmada nos sequenciamentos das sete linhagens de *M. hyopneumoniae* com genomas atualmente disponíveis (232, 7448, J, 168, 168-L, 7422 e KM014) (MINION *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2017). Seus genomas variam entre 0,89 Mb e 0,96 Mb e o conteúdo G+C perfaz apenas 28,5% do genoma. A maior parte do genoma, superior a 80%, é constituído de regiões codificadoras, sendo identificados entre 726 (*M. hyopneumoniae* 232) e 790 genes (*M. hyopneumoniae* KM014) nessa espécie (dados do *site* do NCBI – outubro/2018).

A partir da disponibilidade dos genomas sequenciados, as análises de diversos processos regulatórios nessa bactéria puderam ser iniciadas. A análise da organização do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 revelou que a maior parte dos genes da bactéria são transcritos em mRNAs policistrônicos, com apenas 5% dos genes sendo transcritos em mRNAs monocistrônicos (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Posteriormente, a análise transcritômica de *M. hyopneumoniae* confirmou a tendência da co-expressão dos mRNAs em unidades transcricionais policistrônicas, além de mostrar que quase todos os seus genes são expressos em algum nível basal (SIQUEIRA *et al.*, 2014). Essa organização genômica possibilita uma economia significativa de energia para a bactéria, pois apenas um aparato transcricional é montado para a transcrição de vários genes (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Com base na análise do genoma, as sequências promotoras e terminadoras de *M. hyopneumoniae* também foram analisadas. Weber e colaboradores (2012) fizeram a predição dos promotores de *M. hyopneumoniae* 7448 e determinaram sua sequência consenso como TATAAT, idêntica à sequência canônica do elemento promotor -10 do fator σ^{70} de *Escherichia coli*. Nenhum padrão conservado correspondendo ao elemento -35 foi identificado (WEBER *et al.*, 2012). Quanto ao término da transcrição, como a terminação Rho-dependente parece não ocorrer em *Mycoplasma* spp. (RAZIN *et al.*, 1998), Fritsch e colaboradores (2015) fizeram a predição de terminadores intrínsecos no genoma de *M. hyopneumoniae*. Os autores propuseram um padrão de formação de grampo (*hairpin*) de RNA durante o processo de terminação e fizeram a predição da localização

dos terminadores no genoma de *M. hyopneumoniae*, identificando terminadores intrínsecos putativos em 76% das unidades transcricionais (FRITSCH *et al.*, 2015). Ainda em relação a elementos regulatórios relacionados à sequência de DNA, Cattani e colaboradores (2016) identificaram que repetições de DNA em tandem e palíndromos podem ter potencial regulatório no perfil transcricional de *M. hyopneumoniae*, mostrando diferentes níveis de conservação dos elementos repetitivos entre linhagens patogênicas e não-patogênicas.

Diversos estudos de expressão utilizando microarranjos demonstraram que *M. hyopneumoniae* é capaz de regular seus genes em resposta às alterações ambientais (MADSEN *et al.*, 2006a; MADSEN *et al.*, 2006b; SCHAFER *et al.*, 2007; ONEAL *et al.*, 2008; MADSEN *et al.*, 2008). Além dos genes, foi visto que *M. hyopneumoniae* é capaz de alterar a expressão de pequenos RNAs não-codificadores em resposta ao estresse (SIQUEIRA *et al.*, 2016). A descoberta de sRNAs e seus alvos em *M. hyopneumoniae* (SIQUEIRA *et al.*, 2016) traz luz a novos mecanismos de regulação nessa bactéria e mostra que redes regulatórias globais complexas podem estar envolvidas em sua regulação gênica, o que se pensaria ser inesperado ao analisar a simplicidade do seu genoma.

1.4 – *Mycoplasma flocculare*

M. flocculare é uma espécie do gênero *Mycoplasma* amplamente distribuída nos rebanhos suínos, sendo frequentemente isolada do trato respiratório. Coloniza a cavidade nasal bem como as mucosas do trato respiratório inferior (ROSS & WHITTLESTONE, 1983), podendo ser encontrada em pulmões normais e com lesões pneumônicas (KOBISCH & FRIIS, 1996). No entanto, não é considerada uma bactéria patogênica e nenhuma doença foi relacionada a sua presença. *M. flocculare* é capaz de aderir às células do trato respiratório, mas sem ocasionar danos ao epitélio ciliar (YOUNG *et al.*, 2000) (Figura 2). Seu estudo tem atraído interesse devido a sua grande similaridade com *M. hyopneumoniae* (KOBISCH & FRIIS, 1996).

O primeiro isolamento e descrição de *M. flocculare* foi feito por Meyling e Friis (1972). Assim como *M. hyopneumoniae*, os suínos são seus únicos hospedeiros naturais e não há a descrição do isolamento de *M. flocculare* em qualquer outra espécie animal (KOBISCH & FRIIS, 1996). Seu crescimento é lento e fastidioso, no entanto, seu cultivo *in vitro* é possível no meio Friis (FRIIS, 1975).

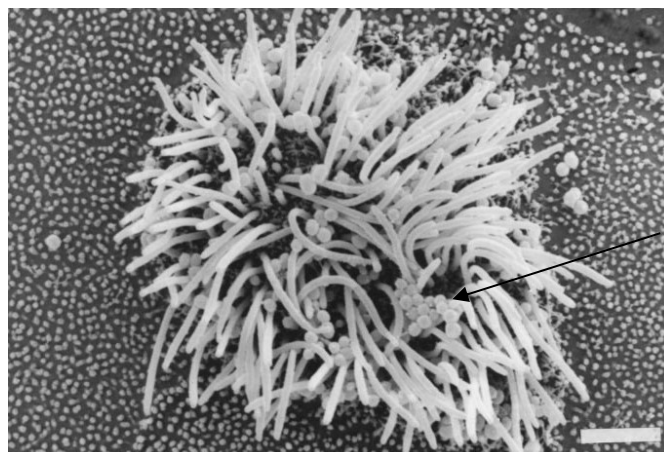


Figura 2. Eletromicrografia de células epiteliais suínas infectadas com *M. flocculare*. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a aderência de *M. flocculare* ao epitélio ciliado, sem causar danos ao tecido. Escala: 2 μ m. Adaptado de Young *et al.* (2000).

Os mesmos fatores que dificultam o isolamento de *M. hyopneumoniae* estão presentes quando se tenta isolar *M. flocculare*. Além do crescimento lento, a similaridade com outras espécies de micoplasmas no trato respiratório, principalmente com *M. hyopneumoniae*, restringe o emprego de algumas ferramentas de identificação desses agentes (FREEMAN *et al.*, 1984; PETERSEN *et al.*, 2016). Análises de sequências de DNA dessas espécies permitiram a detecção de algumas diferenças entre elas, relacionadas principalmente a sintenia (BLANK & STEMKE, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Porém comparações em nível de rRNA 16S evidenciaram uma alta similaridade, confirmando a estreita relação filogenética entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* (STEMKE *et al.*, 1992; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

A alta similaridade com *M. hyopneumoniae* fez com que houvesse interesse em sequenciar o genoma de *M. flocculare*, a fim de compará-lo com essa espécie e identificar os fatores relacionados à patogênese. Atualmente as sequências completas dos genomas de duas linhagens de *M. flocculare* estão disponíveis (SIQUEIRA *et al.*, 2013; CALCUTT *et al.*, 2015). Seu genoma tem cerca de 0,77 Gb e um conteúdo de G+C de aproximadamente 29%, sendo um pouco menor que o genoma de *M. hyopneumoniae* (SIQUEIRA *et al.*, 2013). O genoma também está organizado principalmente em unidades transcricionais policistrônicas, com 98% dos genes sendo transcritos em condições padrão de cultivo, e foram identificados pequenos RNAs não-codificadores que parecem estar envolvidos na regulação gênica (SIQUEIRA *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2016).

1.5 – *Mycoplasma hyorhinis*

M. hyorhinis é uma espécie bacteriana associada a artrites, polisserosites, otites e outras desordens clínicas em suínos (THACKER & MINION, 2012), além de estar associada ao complexo de pneumonias suínas (KOBISCH & FRIIS, 1996). Diferentemente das outras espécies do gênero *Mycoplasma* aqui analisadas, apesar de o suíno ser seu hospedeiro natural, *M. hyorhinis* pode infectar outros organismos e tipos celulares. Essa característica faz com que *M. hyorhinis* seja um dos principais contaminantes de culturas celulares em todo o mundo (DREXLER & UPHOFF, 2002; HWANG *et al.*, 2012).

A capacidade de *M. hyorhinis* de infectar diferentes tipos celulares vem sendo amplamente analisada. Estudos têm demonstrado uma surpreendente associação entre *M. hyorhinis* e o desenvolvimento de câncer em seres humanos (VOORDE *et al.*, 2014). Esse microrganismo foi capaz de induzir instabilidade cromossômica e transformações malignas em linhagens celulares após tempo prolongado de exposição, promovendo assim imortalização e propriedades características de células tumorais (NAMIKI *et al.*, 2009; VOORDE *et al.*, 2014). Yang e colaboradores (2010) mostraram a presença de *M. hyorhinis* em 64% das amostras de câncer gástrico analisadas. Curiosamente, a metástase dos linfonodos foi mais evidente em pacientes com tumores positivos para micoplasma. A proteína de superfície p37 de *M. hyorhinis* tem sido largamente estudada na relação entre a bactéria e o desenvolvimento de câncer. Estudos *in vitro* mostraram que p37 inibe a adesão e aumenta a motilidade, migração e invasão de células de tumores gástricos e de próstata (VOORDE *et al.*, 2014). Além disso, a expressão de p37 em células tumorais foi relacionada a metástases pulmonares *in vivo* (GONG *et al.*, 2008). Em fibroblastos, p37 parece estar relacionada à rápida indução da expressão de genes implicados na inflamação e progressão tumoral (GOMERSALL *et al.*, 2015).

Em seu hospedeiro natural, o suíno, *M. hyorhinis* é considerado um membro normal das vias aéreas superiores de animais jovens (THACKER & MINION, 2012). O organismo pode ser isolado tanto de secreções nasais quanto de pulmões, pois após a exposição se espalha facilmente pelas vias aéreas (KOBISH & FRIIS, 1996). *M. hyorhinis* tem predileção pela colonização do trato respiratório (GOIS *et al.*, 1971), no entanto a invasão sistêmica do organismo está associada com a maior parte das doenças relacionadas a essa bactéria, resultando em artrites e polisserosites (HAKKARAINEN *et al.*, 1992; THACKER & MINION, 2012). Entretanto, o mecanismo que permite a *M. hyorhinis*

deixar o sistema respiratório e induzir doença sistêmica ainda é desconhecido, apesar de a presença de outros patógenos ou estresse poderem facilitar a propagação do organismo de forma sistêmica (THACKER & MINION, 2012).

Quanto ao cultivo *in vitro*, *M. hyorhinis* é tipicamente o primeiro micoplasma a crescer no meio de cultura quando se investiga micoplasmoses em suínos (THACKER & MINION, 2012). Seu crescimento é menos fastidioso que o de outras espécies de micoplasmas encontradas no mesmo ambiente, o que o torna um problema para o isolamento de *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, pois seu crescimento rapidamente supera o dessas espécies (WHITTLESTONE, 1979). O meio Friis é o meio de cultivo mais utilizado para o crescimento de *M. hyorhinis* (FRIIS, 1975). Colônias de *M. hyorhinis* se desenvolvem após dois a cinco dias de incubação e tem a morfologia típica de “ovo frito” (KOBISH & FRIIS, 1996) (Figura 3).



Figura 3. Colônias de *M. hyorhinis* em meio sólido. Fotografia de colônias de *M. hyorhinis* crescidas em meio sólido (aumento de 100x). (Imagem do autor)

Devido à importância médica e veterinária de *M. hyorhinis*, sete diferentes linhagens dessa espécie já tiveram seus genomas sequenciados. Destas, uma linhagem foi isolada do trato respiratório de suínos (LIU *et al.*, 2010), uma linhagem foi isolada de focos de artrite (GOODISON *et al.*, 2013) e duas linhagens foram isoladas de culturas celulares (KORNSPAN *et al.*, 2011; CALCUTT *et al.*, 2012). Além destas, outra linhagem derivada de culturas celulares (DBS1050) e a linhagem tipo da espécie (ATCC[®]17981) também foram sequenciadas (sequências depositadas no NCBI – sem anúncio de publicação), além de uma linhagem pertencente a cultivar α , que são linhagens que não podem ser cultivadas em meios tradicionais para o crescimento de micoplasmas (DABRAZHNETSKAYA *et al.*, 2014). Análises genômicas identificaram que *M. hyorhinis* segue o mesmo modelo de

organização gênica descrito para *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, com a maioria de seus genes transcritos em longos RNAs policistrônicos (SIQUEIRA *et al.*, 2014). Outras características, como a regulação por pequenos RNAs não-codificadores também foram evidenciadas (SIQUEIRA *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2016).

1.6 – Patogenicidade dos micoplasmas

Patógenos são definidos como microrganismos que podem causar dano ao hospedeiro, levando à doença (PIROFSKI & CASADEVALL, 2012). Eles se adaptaram para alterar a funcionalidade celular do hospedeiro para seu próprio benefício, promover a sobrevivência, e, em caso de patógenos intracelulares, para gerar um ambiente apropriado para replicação dentro das células do hospedeiro (MONERRI & KIM, 2014). Para estabelecer a infecção, patógenos desenvolveram inúmeras estratégias para contornar as defesas do hospedeiro e explorar sua maquinaria celular, os chamados fatores de virulência. Enquanto patogenicidade é definida como a capacidade de um microrganismo de causar dano a um hospedeiro suscetível, sendo uma variável descontínua (o organismo é patogênico ou não é), a palavra virulência está relacionada ao nível de dano causado pelo microrganismo patogênico, sendo uma variável relativa (considerando a comparação com outro microrganismo) (PIROFSKI & CASADEVALL, 2012).

A base molecular da patogenicidade dos micoplasmas permanece bastante evasiva. Micoplasmas ou são comensais ou causam infecções crônicas, raramente do tipo fulminante (RAZIN *et al.*, 1998). A maior parte dos efeitos patológicos dos micoplasmas parece ser resultado da resposta do hospedeiro à infecção em vez de efeitos tóxicos diretos de componentes celulares micoplasmáticos aos tecidos do hospedeiro (BROWNING *et al.*, 2014). Em contraste com outras bactérias patogênicas e como revelado pela análise do genoma de diversos micoplasmas, as espécies patogênicas de micoplasmas parecem carecer de fatores de virulência primários típicos, como toxinas, invasinas e citolisinas (PILO *et al.*, 2005). Por essa razão, os conceitos clássicos de genes de virulência são geralmente problemáticos e um conceito mais amplo de virulência é usado para essas espécies. Dessa forma, um gene de virulência em micoplasmas é descrito como qualquer gene não essencial para o crescimento convencional *in vitro* que seja essencial para a ótima

sobrevivência (colonização, persistência ou patogenicidade) no hospedeiro (BROWNING *et al.*, 2014).

A adesão às células do hospedeiro é considerada o principal mecanismo de virulência dos micoplasmas (ROSENGARTEN *et al.*, 2000). É um pré-requisito para a colonização e infecção, sendo que a perda da capacidade de adesão por mutações resulta em perda da infectividade, e a reversão para o fenótipo de citoaderência é acompanhada pela recuperação da infectividade e da virulência (RAZIN & HAYFLICK, 2010). Sua importância fica evidente quando se verifica o grande número de genes nos reduzidos genomas dos micoplasmas que codificam proteínas de superfície (RAZIN, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Existem dois tipos principais de adesão descritos para micoplasmas, ambos tendo por base a participação de adesinas. Algumas espécies, como *M. pneumoniae* e *M. genitalium*, possuem uma organela especial formada pelo citoesqueleto, semelhante a uma ponta, com uma alta concentração de moléculas de adesão (*tip organelle*, em inglês), constituindo uma estrutura que permite ao micoplasma aderir à superfície do hospedeiro (KRAUSE, 1998; BURGOS *et al.*, 2006). Outras espécies, como *M. hyopneumoniae*, não possuem todas as proteínas necessárias para a formação da organela completa, tendo as adesinas distribuídas pela membrana celular como mediadoras do processo de adesão (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Apesar dos mecanismos de adesão serem importantes para a virulência, o fato de muitas bactérias comensais também se aderirem às células do hospedeiro, mas não serem patogênicas, realça que alguma forma de dano é requerida para a virulência microbiana (CASADEVALL & PIROFSKI, 2001). Dessa forma, outros mecanismos envolvidos na patogenicidade e virulência de diferentes espécies de *Mycoplasma* foram identificados.

A variação de antígenos de superfície é uma estratégia de virulência importante para organismos que possuem a membrana celular exposta ao hospedeiro, como é o caso dos micoplasmas. Essas bactérias desenvolveram mecanismos para rápida adaptação no hospedeiro, como a variação de lipoproteínas de superfície. Isso é resultado de sistemas genéticos sofisticados que impulsionam a variação com alta frequência (CITTI *et al.*, 2010). As lipoproteínas variáveis (Vlps, do inglês *variable lipoproteins*) foram inicialmente identificadas e descritas em *M. hyorhinae* (ROSENGARTEN & WISE, 1990;

YOGEV *et al.*, 1991). São produtos de uma família gênica capaz de gerar variações no padrão de expressão de lipoproteínas de superfície, em que diferentes células podem expressar diferentes combinações de Vlps, que variam em fase e tamanho (CITTI *et al.*, 2000). Outras espécies de *Mycoplasma* também possuem famílias gênicas responsáveis pela variação de antígenos de superfície (GLEW *et al.*, 1998; SHEN *et al.*, 2000; LYSNYANSKY *et al.*, 2001; FLITMAN-TENE *et al.*, 2003), que podem ser gerados por diversos mecanismos, como deslizamento da DNA polimerase, recombinação homóloga, conversão gênica, duplicação gênica, adição ou deleção de unidades de repetição em tandem e inversões de DNA (RAZIN, 2006).

Foi demonstrado que as variações de fase e tamanho ocorrem espontaneamente e em alta frequência *in vivo* e *in vitro* nos micoplasmas. Além disso, elas parecem ser reversíveis na mesma frequência em que ocorrem (RAZIN, 2006). Essa plasticidade fenotípica, representada pela capacidade de modificar a estrutura e composição de proteínas expostas na superfície celular, contribui para a constante mudança na configuração de antígenos e a consequente evasão do sistema imune do hospedeiro (RAZIN *et al.*, 1998; WOUDE & BÄUMLER, 2004).

Outro mecanismo que os micoplasmas desenvolveram para evadir-se do sistema imune é o mimetismo molecular. O mimetismo molecular refere-se a epítomos antigênicos que parecem ser compartilhados por micoplasmas e células hospedeiras. Esses epítomos estariam supostamente envolvidos na evasão das defesas do hospedeiro e também na indução de autoanticorpos observados durante a infecção com certas espécies de micoplasmas (ROTTEM, 2003). Uma forma adicional de evitar o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro é a invasão celular. Foi demonstrado que diversas espécies do gênero *Mycoplasma* são capazes de invadir células eucarióticas, ao menos *in vitro*, mas os mecanismos responsáveis por esse processo ainda não estão elucidados. Isso contribuiria para a persistência desses patógenos no hospedeiro (BASEMAN *et al.*, 1995; BROWNING *et al.*, 2014).

Além de evadir o sistema imune do hospedeiro, os micoplasmas parecem ser capazes de modulá-lo. Micoplasmas podem estimular, bem como suprimir linfócitos de uma maneira policlonal não-específica, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além de afetar vários subconjuntos de linfócitos, os micoplasmas e seus componentes celulares derivados são capazes de modular as atividades de monócitos, macrófagos e células NK, e desencadear a

produção de uma grande variedade de citocinas e quimiocinas (RAZIN & HYFLICK, 2010). A capacidade de muitos micoplasmas de desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias pode explicar grande parte da patogênese observada durante a infecção. O grau de aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias parece estar relacionado com a severidade da resposta inflamatória na mucosa, de forma que o sistema imune também está envolvido no desenvolvimento de lesões patogênicas e na exacerbação de doenças induzidas por micoplasmas (BROWNING *et al.*, 2011; RAZIN & HYFLICK, 2010).

Também é interessante notar que infecções por micoplasmas não estão necessariamente associadas com uma forte resposta inflamatória, e algumas espécies são capazes de colonizar os tratos respiratório ou urogenital sem causar sintomas clínicos aparentes. Dessa forma é possível especular que certos organismos têm a capacidade de suprimir citocinas pró-inflamatórias ou induzir citocinas anti-inflamatórias, suprimindo a resposta imune do hospedeiro (ROTTEM, 2003). A capacidade de modular a resposta imune contribui para as propriedades patogênicas dos micoplasmas, possibilitando a eles evadir ou suprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro e estabelecer uma infecção crônica persistente (RAZIN, 2006).

Embora não possuam lipopolissacarídeos (LPS), estudos mostram que algumas espécies de micoplasmas, como *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *Mycoplasma pulmonis* e *M. agalactiae*, são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares relacionados com a virulência (PILO *et al.*, 2007; DAUBENSPECK *et al.*, 2009; GAURIVAUD *et al.*, 2016). *M. mycoides* subsp. *mycoides* pode produzir dois tipos de polissacarídeos, uma forma capsular e uma forma não ligada à célula, chamada de exopolissacarídeo. Em ambos os casos, o polissacarídeo parece ter a mesma composição, sendo formado por galactana (BERTIN *et al.*, 2013), mas diferentes composições podem ser encontradas em outras espécies (BERTIN *et al.*, 2015). Linhagens que apresentam a forma capsular do polissacarídeo parecem ser capazes de permanecer por mais tempo no hospedeiro, evadindo suas defesas, enquanto que linhagens que secretam o exopolissacarídeo possuem melhor capacidade de adesão, podendo formar biofilmes (GAURIVAUD *et al.*, 2014). A presença desses componentes em *M. mycoides* subsp. *mycoides* foi relacionada ao aumento da virulência em linhagens atenuadas e com a persistência e disseminação dessa espécie no hospedeiro infectado (PILO *et al.*, 2007).

Apesar de toxinas potentes não serem associadas aos micoplasmas, subprodutos tóxicos do metabolismo têm sido acusados de causar efeito citotóxico às células do hospedeiro (RAZIN, 2006). A maior evidência da liberação de um fator citotóxico tendo papel na virulência de diversos micoplasmas é a produção de peróxido de hidrogênio durante o catabolismo de glicerol. *M. mycoides* subsp. *mycoides* e *M. pneumoniae* são duas espécies em que a produção de peróxido de hidrogênio está associada com efeitos citotóxicos no hospedeiro (PILO *et al.*, 2005; HAMES *et al.*, 2009). A enzima glicerol-3-fosfato oxidase (glpO) catalisa a oxidação de glicerol-3-fosfato em di-hidroxiacetona fosfato, com conseqüente liberação de uma molécula de H₂O₂ (PILO *et al.*, 2005). Ao contrário de outras bactérias, em que os genes de metabolismo do glicerol parecem ser expressos apenas na ausência de fontes preferenciais de carbono e na presença de glicerol, em *M. pneumoniae* eles são expressos constitutivamente, indicando sua importância nessa bactéria (HAMES *et al.*, 2009).

Além da atividade de glpO, a produção do metabólito tóxico também está associada à disponibilidade de glicerol intracelular, pois linhagens de micoplasmas que transportam mais glicerol intracelularmente parecem produzir maiores quantidades de peróxido de hidrogênio (VILEI & FREY, 2001). A intensidade da produção de peróxido também pode estar associada com a localização intracelular de glpO. Enquanto que em *M. pneumoniae* essa é uma proteína citoplasmática, em *M. mycoides* subsp. *mycoides*, uma espécie com uma produção muito mais abundante de peróxido de hidrogênio, a glpO está localizada na membrana, e é ao menos parcialmente exposta na superfície celular (PILO *et al.*, 2005; HAMES *et al.*, 2009). O contato íntimo com o hospedeiro é necessário para translocar com sucesso o peróxido de hidrogênio para as células hospedeiras. Dentro destas, esse componente tóxico age como um mediador poderoso de injúria celular e indutor do processo de inflamação, podendo levar à morte celular (PILO *et al.*, 2005).

A produção de outros componentes tóxicos foi identificada em diferentes espécies de *Mycoplasma*, como a produção da toxina CARDS em *M. pneumoniae*. Essa toxina tem atividade de ADP-ribosilase e provoca vacuolização e morte celular em células de mamíferos (KANNAN & BASEMAN, 2006). A produção de sulfeto de hidrogênio, responsável por causar hemólise, também foi demonstrada em *M. pneumoniae* (GROßHENNIG *et al.*, 2016). Sialidase é outro componente produzido por micoplasmas patogênicos, como *Mycoplasma alligatoris* e *Mycoplasma synoviae*, e pode causar

degradação da matriz extracelular e apoptose de fibroblastos pulmonares (HUNT & BROWN, 2007; MAY *et al.*, 2008). A presença desse composto pode explicar por que *M. alligatoris* causa uma doença cardiopulmonar aguda e letal, enquanto sua espécie relacionada menos virulenta *Mycoplasma crocodyli*, que não possui sialidase, causa apenas pneumonia leve (HUNT & BROWN, 2007).

Em virtude do que foi apresentado, percebe-se que a patogenicidade dos micoplasmas é resultado da ação coordenada de vários componentes. Enquanto alguns fatores parecem ser essenciais para a virulência de determinadas espécies, em outras espécies os mesmos fatores podem ser dispensáveis (SZCZEPANEK *et al.*, 2014). Os diferentes atributos de virulência permitem aos micoplasmas patogênicos evadir e modular a defesa imune do hospedeiro, se aderir firmemente à superfície da célula hospedeira, liberar metabólitos tóxicos que causam danos ao hospedeiro, persistir e se disseminar no hospedeiro, e causar inflamação e doença. A combinação de diferentes atributos de virulência varia entre diferentes espécies do gênero *Mycoplasma*, o que pode explicar as diferenças de patogenicidade e níveis de virulência existentes entre elas.

1.7 – Patogenicidade de *M. hyopneumoniae*

A patogenicidade de *M. hyopneumoniae* é complexa e envolve diversos fatores, como tempo de colonização do epitélio respiratório, estado imune do hospedeiro e interação com outros agentes infecciosos (THACKER & MINION, 2012). Assim como para a maioria dos micoplasmas, as lesões associadas com *M. hyopneumoniae* parecem ser resultado principalmente da reação imune e inflamatória do hospedeiro. Apesar da relativamente baixa exposição da bactéria ao sistema imune do suíno, *M. hyopneumoniae* causa uma imunossupressão geral e também induz uma resposta imune localizada nos animais infectados, a qual é responsável por danos adicionais ao epitélio respiratório (FERREIRA & CASTRO, 2007). O padrão de infecção e a severidade da doença são fortemente determinados pela virulência do isolado de *M. hyopneumoniae*, bem como pelas práticas de manejo e condições ambientais (VILLARREAL *et al.*, 2009).

Em *M. hyopneumoniae*, o estudo dos fatores de virulência também está centrado principalmente na caracterização das moléculas de adesão. Inicialmente acreditava-se que *M. hyopneumoniae* se aderiria apenas aos cílios do epitélio da traqueia, no entanto a bactéria

parece se aderir a diversos tipos celulares, incluindo macrófagos alveolares suínos, células epiteliais alveolares e células renais suínas (PK15) (CHE *et al.*, 2013 apud LIU *et al.*, 2017a). Embora a forma exata como a bactéria se adere à célula hospedeira ainda não tenha sido completamente elucidada (THACKER & MINION, 2012), diversas proteínas envolvidas com a adesão foram identificadas. A principal adesina identificada em *M. hyopneumoniae* é a proteína P97. Estudos com anticorpos monoclonais identificaram que P97 tem um papel importante na adesão de *M. hyopneumoniae* aos cílios, uma vez que a presença desses anticorpos bloqueou a adesão da bactéria ao epitélio *in vitro* (ZHANG *et al.*, 1995). No entanto, o bloqueio da região R1 de P97, responsável pela ligação da proteína aos cílios (HSU & MINION, 1998), não inibiu completamente a adesão de *M. hyopneumoniae* ao epitélio (ZHANG *et al.*, 1995), indicando que outras proteínas estão envolvidas nesse processo. Uma delas é a adesina P102, localizada no mesmo operon que o gene que codifica P97, sendo esses genes co-transcritos e expressos durante a infecção (ADAMS *et al.*, 2005).

Além destas, diversas outras adesinas já foram identificadas nessa bactéria, como MgPa, P69, P76, P110, P146, P216, dentre outras (VASCONCELLOS *et al.*, 2005). Diversas dessas proteínas têm a capacidade de se ligar a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, plasminogênio e heparina (Tabela 1). A ligação de proteínas de superfície à heparina é importante, pois esta bloqueia a ligação de *M. hyopneumoniae* aos cílios do epitélio. Além disso, a ligação de heparina na superfície dá à bactéria a capacidade de interagir com uma diversidade de moléculas do hospedeiro e contornar a necessidade de receptores individuais (JENKINS *et al.*, 2006). Quanto ao plasminogênio, o sequestro dessa molécula por *M. hyopneumoniae* em sua superfície facilita sua conversão em plasmina, processo que pode levar a invasão tecidual e infecção sistêmica (BOGEMA *et al.*, 2012). A fibronectina, por sua vez, é abundante na matriz extracelular do hospedeiro, e muitos patógenos possuem adesinas que interagem com esta molécula, desempenhando um papel importante na adesão e na invasão celular (DEUTSCHER *et al.*, 2010). A Tabela 1 mostra algumas das principais proteínas de adesão de *M. hyopneumoniae* e seus ligantes.

Tabela 1. Principais proteínas conhecidas relacionadas à adesão em *M. hyopneumoniae*.

Nome	ID MHP7448	Ligante	Referência
P97-like	MHP7448_0272	Epitélio ciliar, heparina, fibronectina, plasminogênio	Seymour <i>et al.</i> , 2011
P116 ou P102-like	MHP7448_0271	Epitélio ciliar, fibronectina, plasminogênio	Seymour <i>et al.</i> , 2010
P97	MHP7448_108	Epitélio ciliar, heparina, fibronectina	Deutscher <i>et al.</i> , 2010
P216	MHP7448_496	Epitélio ciliar, heparina	Wilton <i>et al.</i> , 2009
P159, P110 ou P76	MHP7448_0497	Epitélio ciliar, heparina	Burnett <i>et al.</i> , 2006
P97	MHP7448_198	Epitélio ciliar, heparina	Jenkins <i>et al.</i> , 2006
P102	MHP7448_199	Epitélio ciliar, fibronectina, plasminogênio	Seymour <i>et al.</i> , 2012
Proteína hipotética	MHP7448_0662	Epitélio ciliar, heparina	Bogema <i>et al.</i> , 2011
P146	MHP7448_0663	Epitélio ciliar, heparina, plasminogênio	Bogema <i>et al.</i> , 2012
Proteína hipotética	MHP7448_0373	Epitélio ciliar, heparina	Deutscher <i>et al.</i> , 2012
Proteína hipotética	MHP7448_0372	Epitélio ciliar, heparina	Deutscher <i>et al.</i> , 2012

Adaptado de Siqueira *et al.*, 2013.

Outra característica importante relacionada à patogenicidade de *M. hyopneumoniae* é a variação antigênica. Diversas moléculas bacterianas de superfície são antigênicas e essa propriedade está frequentemente associada com a patogênese. Em *M. hyopneumoniae* existem diversas evidências que indicam a existência de variação antigênica utilizando mecanismos que envolvem modificações no DNA ou nas proteínas. Variações no número de sequências repetidas de nucleotídeos em regiões codificadoras do DNA podem ser observadas nas diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae*, resultando em alterações no número de repetições de aminoácidos em suas proteínas, processo observado em diversas proteínas de membrana (variação de tamanho) (VASCONCELOS *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2006). Além disso, a variação de nucleotídeos não parece ocorrer apenas nas regiões codificadoras, tendo sido demonstrada a presença de variabilidade em regiões intergênicas, potencialmente realizando um processo “liga/desliga” dos genes associados (FERREIRA & CASTRO, 2007).

Além das variações de sequência dos nucleotídeos, modificações pós-traducionais ocasionadas pelo processamento proteolítico em proteínas antigênicas de *M. hyopneumoniae* já foram descritas, sendo encontradas principalmente em adesinas e lipoproteínas de superfície (DJORDJEVIC *et al.*, 2004; BURNETT *et al.*, 2006; PINTO *et*

al 2007; TACCHI *et al.*, 2016). Os produtos da clivagem dessas proteínas são translocados para a superfície celular de *M. hyopneumoniae* e permanecem associados a ela durante o crescimento, pelo menos *in vitro* (DJORDJEVIC *et al.*, 2004). É interessante observar que o processamento dessas proteínas parece ser linhagem-específico (BURNETT *et al.*, 2006) e em diferentes linhagens, fragmentos de diversas proteínas são apresentadas ao hospedeiro, levando a uma topografia de superfície altamente dinâmica. Isso pode ter um papel importante nas propriedades de adesão de diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae* e também estar relacionado às capacidades de imunomodulação e evasão do sistema imune do hospedeiro (FERREIRA & CASTRO, 2007).

Além de serem alvos de variabilidade antigênica, muitas lipoproteínas de membrana têm um papel nos mecanismos de patogenicidade, pois são conhecidas por induzirem citocinas pró-inflamatórias (FERREIRA & CASTRO, 2007). A expressão de interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF)- α foi observada em suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* (CHOI *et al.*, 2006; MUNETA *et al.*, 2008). Além disso, proteínas de membrana de *M. hyopneumoniae* também foram capazes de induzir a produção de óxido nítrico e apoptose em macrófagos alveolares suínos e em linhagens de células epiteliais (BAI *et al.*, 2013; NI *et al.*, 2015; PAES *et al.*; 2017). Um estudo recente identificou que o colesterol, um constituinte essencial para o crescimento dos micoplasmas, também pode estar relacionado com a indução de apoptose em macrófagos alveolares *in vitro*, além de aumentar a adesão de *M. hyopneumoniae* a essas células (LIU *et al.*, 2017a).

A indução da produção de citocinas pró-inflamatórias tem um papel na mediação e regulação da inflamação e parece ser um efeito direto da infecção causada por *M. hyopneumoniae* (CHOI *et al.*, 2006). Tais citocinas levam ao acúmulo de um grande número de leucócitos no tecido pulmonar, uma das principais características da infecção causada por essa bactéria. Dessa forma, a ativação e a infiltração de leucócitos é provavelmente um dos eventos-chave na progressão da pneumonia causada por *M. hyopneumoniae* (MUNETA *et al.*, 2008). O grande número de citocinas pró-inflamatórias induzidas por *M. hyopneumoniae* pode estar envolvido na imunomodulação do hospedeiro. Tanto IL-1 quanto TNF- α são fatores de ativação para linfócitos T. Parece que a superprodução dessas citocinas pode exacerbar o efeito direto de *M. hyopneumoniae* e levar a danos teciduais mediados pelo hospedeiro (CHOI *et al.*, 2006). Além disso, a

apoptose excessiva de células imunes resulta em imunossupressão com maior suscetibilidade à reinfecção, que está associada ao aumento da severidade de infecções secundárias (THACKER *et al.*, 1999). Dessa forma, a infecção por *M. hyopneumoniae* não causa apenas dano físico ao sistema respiratório suíno, mas altera a resposta imune do hospedeiro, resultando em injúria tecidual e doença.

Existem ainda outras características relacionadas à virulência de *M. hyopneumoniae*, como a capacidade de formar biofilmes. Tassew e colaboradores (2017) identificaram três linhagens de *M. hyopneumoniae* isoladas de suínos com casos confirmados de pneumonia capazes de produzir biofilmes e secretar exopolissacarídeos *in vitro*. No entanto, os mecanismos responsáveis por esse efeito ainda são desconhecidos.

Diversos níveis de virulência têm sido observados em diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae* (VICCA *et al.*, 2003; VILLARREAL *et al.*, 2009). Além disso, sua espécie filogeneticamente mais próxima, *M. flocculare*, é comensal e não causa doença em suínos (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Essas diferenças levam a um grande número de estudos na busca de fatores que expliquem as diferenças relacionadas à virulência e patogenicidade nessas espécies (LIU *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013, 2014; FERRARINI *et al.*, 2016; PAES *et al.*, 2016). Os estudos comparativos confirmam que as adesinas desempenham um papel importante na virulência e na patogenicidade. Entretanto, somente as proteínas de adesão não explicam os diferentes níveis de virulência entre linhagens e espécies. *M. flocculare* possui ortólogos para todas as adesinas de *M. hyopneumoniae*, com exceção de uma cópia de P97 e de P102 (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Além disso, o fato da linhagem J de *M. hyopneumoniae*, com reduzida capacidade de adesão, ter P97 aparentemente funcional reforça a ideia de que a virulência é de natureza multifatorial (FERREIRA & CASTRO, 2007). Ainda que diferenças de variantes proteicas e de níveis de expressão e processamento pós-traducional de adesinas estejam presentes (SIQUEIRA *et al.*, 2013), somente isso não explica as diferenças de patogenicidade das espécies analisadas. É importante salientar o grande número de proteínas hipotéticas no genoma das espécies de *Mycoplasma* aqui analisadas, que pode conter genes ainda não identificados relacionados à virulência. Dessa forma, até o momento não há fatores claros que diferenciem entre linhagens patogênicas e não patogênicas de *M. hyopneumoniae* ou que difiram a bactéria patogênica *M. hyopneumoniae* da bactéria comensal *M. flocculare*.

Ferrarini e colaboradores (2016) fizeram a reconstrução das redes metabólicas de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis* e identificaram algumas diferenças que podem ajudar a explicar as diferenças de patogenicidade e níveis de virulência entre essas espécies. A principal diferença diz respeito ao metabolismo de glicerol e a suposta capacidade de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* utilizarem esse álcool como fonte de carbono, e nesse processo produzir o metabólito tóxico peróxido de hidrogênio. A enzima responsável por esse processo, glpO (glicerol-3-fosfato oxidase), está presente nessas espécies, mas ausente em *M. flocculare* (Figura 4). A produção de peróxido de hidrogênio pela ação de glpO já foi descrita em *M. pneumoniae* e é essencial para a patogênese dessa bactéria (HAMES *et al.*, 2009). A segunda diferença significativa encontrada por Ferrarini e colaboradores está relacionada à presença de uma unidade transcricional completa (com exceção de um gene) codificando proteínas para a absorção e metabolismo de mio-inositol apenas no genoma de *M. hyopneumoniae*.

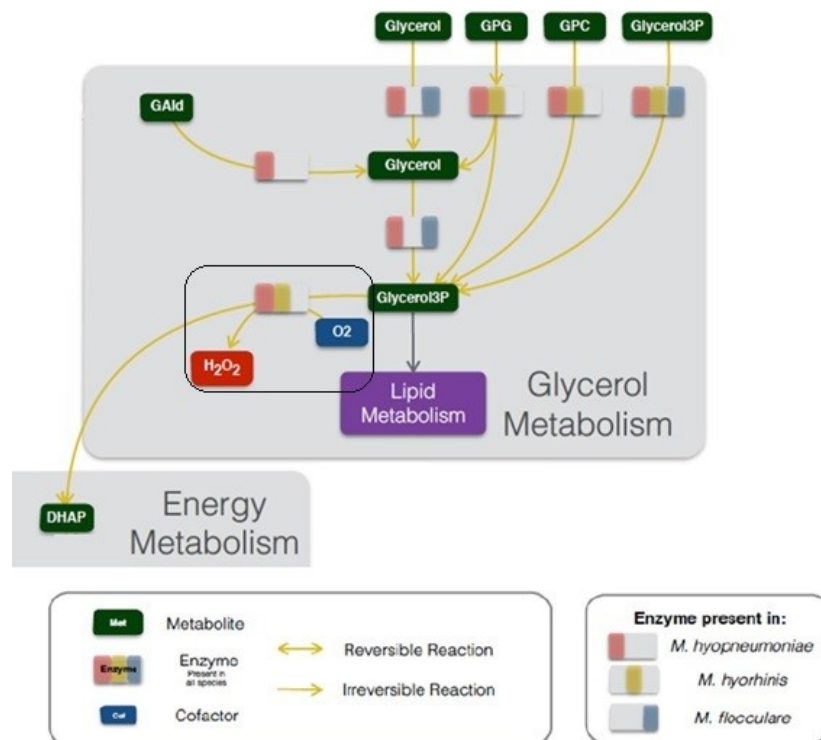


Figura 4. Metabolismo diferencial de glicerol em *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis*. Representação esquemática mostrando as diferenças no metabolismo de glicerol nas espécies de micoplasmas suínos. *M. flocculare* não possui a enzima responsável pela produção do metabólito tóxico peróxido de hidrogênio (em destaque). Adaptado de Ferrarini *et al.* (2016).

Recentemente, uma revisão publicada por Maes e colaboradores (2017) enfatiza a necessidade de maiores investigações do papel dos metabolismos de glicerol e mio-inositol e sua contribuição para a virulência de *M. hyopneumoniae*. A produção de peróxido de hidrogênio é um mecanismo de virulência e citotoxicidade presente em várias espécies do gênero *Mycoplasma* (PILO *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2005; HAMES *et al.*, 2009), no entanto estudos funcionais detectando sua produção em *M. hyopneumoniae* ainda não foram realizados. Quanto ao catabolismo de mio-inositol, este ainda não está descrito em nenhuma espécie do gênero *Mycoplasma* e, se mostrado funcional em *M. hyopneumoniae*, pode representar para essa bactéria uma fonte de energia que não precisa ser disputada com outros organismos presentes no sistema respiratório suíno.

1.8 – Exossomos

As células eucarióticas são capazes de produzir uma variedade de vesículas de membrana que são liberadas no meio extracelular. Essas vesículas podem funcionar como um eficiente sistema de sinalização e comunicação celular e podem afetar as células que as encontram de maneiras complexas. As vesículas extracelulares variam entre 10 e 1000 nm de diâmetro e são secretadas por virtualmente todos os tipos celulares. Entre as vesículas extracelulares liberadas pelas células encontram-se exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Essas estruturas são classificadas de acordo com sua origem celular ou biogênese e possuem especificidades que as diferenciam das demais (Figura 5).

Dentre as vesículas extracelulares, os corpos apoptóticos são os mais fáceis de identificar, pois têm características mais bem definidas. São as maiores dentre as vesículas extracelulares, variando entre 2 e 4 μm e são formados por células em processo de apoptose (EVANS-OSES *et al.*, 2015). Exossomos e microvesículas são mais difíceis de diferenciar, pois propriedades como tamanho, morfologia e densidade parecem não ser suficientes para uma distinção clara entre eles. O que evidentemente diferencia essas duas vesículas é sua origem celular (RAPOSO & STOORVOGEL, 2013; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Enquanto microvesículas variam entre 100 e 1000 nm e são formadas por brotamento da membrana plasmática, exossomos são vesículas de origem endocítica que variam entre 50 e 150 nm e são liberados através da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática (RAPOSO & STOORVOGEL, 2013; EVANS-OSES *et al.*,

2015). Corpos multivesiculares são formados durante a maturação endossômica e podem ter dois destinos – se fundir a lisossomos e levar à degradação de seu conteúdo luminal, ou se fundir à membrana plasmática e liberar os exossomos no meio extracelular (ROME, 2013).

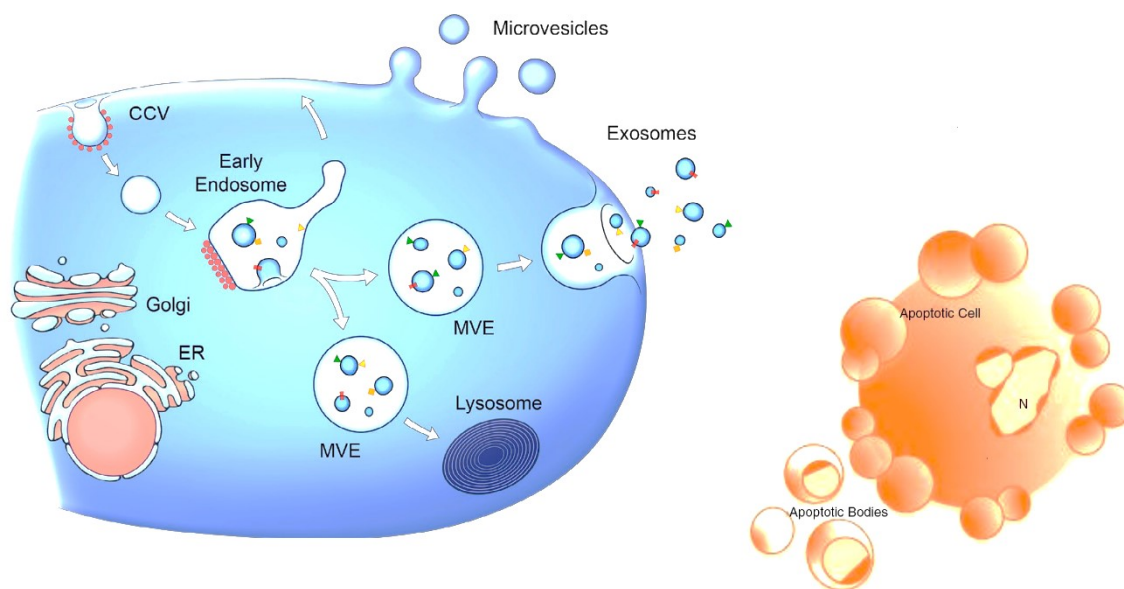


Figura 5. Biogênese e liberação de vesículas extracelulares. As vesículas extracelulares são classificadas em três classes principais: microvesículas, produzidas por brotamento ou fissão da membrana plasmática; exossomos, formados na via endossomal e liberados sob fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática; e corpos apoptóticos, liberados como bolhas de células submetidas à apoptose. CCV – vesículas revestidas de clatrina; MVE – corpo multivesicular. Adaptado de Raposo e Stoorvogel, (2013) e Yáñez-Mó *et al.* (2015).

Exossomos foram identificados na maioria dos fluidos celulares (sangue, leite materno, saliva, urina) e foram purificados de quase todos os tipos celulares de mamíferos (células epiteliais, neuronais, musculares, células-tronco) (PETHÕ *et al.*, 2018). Eles podem estar envolvidos em diversas funções fisiológicas e estados patológicos, sendo liberados das células tanto constitutivamente quanto sob indução. Essas vesículas carregam receptores/ligantes de superfície da célula de origem e têm o potencial de interagir seletivamente com células-alvo específicas (ROME, 2013). Além disso, diversos estudos indicam que os exossomos podem transferir informações e sinais entre células vizinhas ou tecidos distantes através da transferência de RNAs, proteínas e lipídeos (FORTERRE *et al.*, 2014). Interessantemente, evidências indicam que a seleção do conteúdo dos

exossomos ocorre não-randomicamente, com algumas populações de moléculas sendo preferencialmente empacotadas nos exossomos, uma vez que certos mRNAs e miRNAs estão presentes predominantemente ou em níveis mais elevados nos exossomos do que nas células de origem (VALADI *et al.*, 2007; ROME, 2013).

A composição dos exossomos varia de acordo com sua origem celular e estado patofisiológico e pode determinar sua funcionalidade de diferentes maneiras. Receptores e ligantes expostos na superfície são responsáveis pela sua biodistribuição e pela sua ligação a células-alvo (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Curiosamente, a análise da composição de proteínas dos exossomos demonstrou que sua diversidade proteica é limitada – exossomos não contêm proteínas de origem nuclear, mitocondrial, do retículo endoplasmático ou do aparato de Golgi. Além disso, todas as proteínas exossomais identificadas foram encontradas no citosol, nas membranas de compartimentos endocíticos ou na membrana plasmática (PETHÖ *et al.*, 2018). Proteínas de membrana conhecidas por se agruparem em microdomínios, como as tetraspaninas, estão enriquecidas nos exossomos. Tetraspaninas como CD63, CD81, CD82, CD53 e CD37 foram identificadas pela primeira vez em exossomos de linfócitos B, onde elas podem estar enriquecidas mais de 100 vezes. Estudos apontam que essas proteínas também são abundantes em exossomos de outras origens, de forma que passaram a ser utilizadas como marcadores de exossomos (RAPOSO & STOORVOGEL, 2013).

Uma grande descoberta relacionada ao estudo dos exossomos foi a demonstração de que sua carga contém tanto mRNAs quanto miRNAs e que os mRNAs podem ser traduzidos em proteínas nas células-alvo (VALADI *et al.*, 2007). Dentre as moléculas empacotadas nos exossomos, os miRNAs são de especial interesse, pois estão sabidamente envolvidos na regulação gênica, podendo assim modular alvos nas células receptoras (FORTERRE *et al.*, 2014). Além destes, diversos tipos de pequenos RNAs não-codificadores foram encontrados nos exossomos, como RNAs estruturais, fragmentos de tRNAs, RNA Y e pequenos RNAs de interferência (BELLINGHAM *et al.*, 2012; NOLTE-‘T HOEN *et al.*, 2012). Exossomos podem ainda induzir mudanças no fenótipo das células receptoras através da transferência de receptores funcionalmente ativos (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Embora alguns estudos indiquem que a internalização dos exossomos pelas células receptoras ocorre por endocitose (TIAN *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2013), outros

estudos indicam que a internalização do seu conteúdo ocorre através da fusão de sua membrana com a membrana plasmática das células receptoras (PAROLINI *et al.*, 2009). A possível explicação para isso é que a via de captação das vesículas depende da interação entre as moléculas de superfície dos exossomos e os receptores na membrana plasmática, além das condições ambientais em que essa interação ocorre, como o pH do ambiente extracelular (PAROLINI *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2017). As diferentes origens dos exossomos e o tipo de célula receptora podem levar a modos diferentes de interação (TIAN *et al.*, 2010; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Enquanto a liberação de vesículas por patógenos eucarióticos durante a infecção foi descrita apenas mais recentemente como uma potencial estratégia de virulência (MARCILLA *et al.*, 2012), a liberação de vesículas por células hospedeiras infectadas já é conhecida há algum tempo. Em alguns casos, ela parece ser benéfica para o hospedeiro, e em outros, benéfica para o patógeno. Estudos sobre exossomos liberados por macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis* demonstraram que esses exossomos continham antígenos patógeno-derivados e as vesículas induziam a produção de citocinas pró-inflamatórias por células virgens, ativando vias pró-inflamatórias (BHATNAGAR *et al.*, 2007). Por outro lado, exossomos liberados por células com infecções virais parecem ter efeitos deletérios para o hospedeiro e favorecer a infecção (SILVERMAN & REINER, 2011). O mesmo ocorre com exossomos liberados de células tumorais, que parecem contribuir para a progressão tumoral, promovendo a angiogênese e a migração de células tumorais em forma de metástases (RAPOSO & STOOORVOGEL, 2013).

Atualmente está bem estabelecido que os exossomos são importantes para o funcionamento celular em diversos eventos biológicos, como comunicação intercelular, transporte, tumorigênese e metabolismo, além de ter inúmeras aplicações em diagnósticos e terapias de diversas patologias (PETHÕ *et al.*, 2018). Exossomos têm a capacidade de proteger sua carga interna e o potencial de transmiti-la para tipos celulares específicos através das interações receptor-ligante. Além disso, eles têm o potencial de atravessar barreiras teciduais, como a barreira hematoencefálica. Seu potencial de endereçamento e penetração de barreiras fazem deles promissores veículos terapêuticos de entrega. Ainda, a presença universal em fluidos biológicos, a liberação por todos os tipos celulares e mudanças no conteúdo molecular baseadas no estado patofisiológico das células de origem

fazem dos exossomos notáveis marcadores moleculares (MAAS *et al.*, 2017). Sobretudo, a investigação dos alvos de pequenos RNAs contidos nos exossomos pode ser importante para entender como as vesículas extracelulares podem modificar a regulação gênica e modular as células receptoras.

1.9 – miRNAs

MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são uma classe de pequenos RNAs não-codificadores de 18-24 nucleotídeos que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em eucariotos. Essas moléculas evolutivamente conservadas influenciam processos biológicos fundamentais, tais como proliferação celular, diferenciação, apoptose, resposta imune e metabolismo, determinando o destino celular, e alterações na sua capacidade regulatória podem levar ao desenvolvimento de patologias (BARTEL, 2004; WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015; LUO *et al.*, 2017). Desde sua descoberta em *Caenorhabditis elegans*, em 1993 (LEE *et al.*, 1993), os miRNAs têm ganhado destaque por sua capacidade de regular finamente a expressão gênica. Naquele trabalho, Lee e colaboradores mostraram que um pequeno RNA, lin-4, tinha complementariedade parcial com a região 3'UTR do mRNA que codifica a proteína lin-14, levando à redução da expressão dessa proteína. Posteriormente, a descoberta de let-7 no mesmo organismo ajudou a confirmar essa classe de RNAs não-codificadores (REINHART *et al.*, 2000).

Os miRNAs apresentam um alto grau de conservação em suas sequências e mecanismos de ação entre diferentes organismos (BARTEL, 2004). Embora inicialmente se acreditasse que os miRNAs fossem codificados em regiões intergênicas, atualmente foi verificado que a maioria dos genes que dão origem aos miRNAs em humanos encontram-se em íntrons de RNA codificadores e não-codificadores (KIM & NAM, 2006; PAULEY & CHAN, 2008). Os miRNAs são inicialmente transcritos como longos precursores de fita dupla (pri-miRNA) dentro do núcleo celular. Ainda no núcleo, pela ação da enzima Drosha, o pri-miRNA é clivado e convertido em miRNA precursor (pré-miRNA) em forma de grampo. O pré-miRNA então é transportado para o citoplasma, onde sofre a ação da enzima Dicer, uma ribonuclease III, produzindo uma fita dupla (miRNA:miRNA*) de aproximadamente 22 nucleotídeos. Após a separação desse dúplice de RNA, uma das fitas (miRNA*) é degradada e a outra (miRNA maduro) é acoplada a um complexo de

silenciamento induzido por miRNA (miRISC) para agir nos mRNAs-alvo (LEE *et al.*, 2003; BARTEL, 2004; WINTER *et al.*, 2009). A Figura 6 mostra a via canônica de biogênese e maturação de miRNAs. Uma via alternativa para maturação de miRNAs independente de Drosha foi descoberta em alguns organismos (RUBY *et al.*, 2007; BEREZIKOV *et al.*, 2007). Nessa via, os miRNAs podem ser derivados do *splicing* de sequências intrônicas de mRNA que imitam características estruturais de pré-miRNAs e são referidos como mirtrons. Os mirtrons podem entrar na via de biogênese de miRNAs sem clivagem mediada por Drosha, no entanto, essas estruturas representam apenas um pequeno número dentre os miRNAs conhecidos (PAULEY & CHAN, 2008; WINTER *et al.*, 2009).

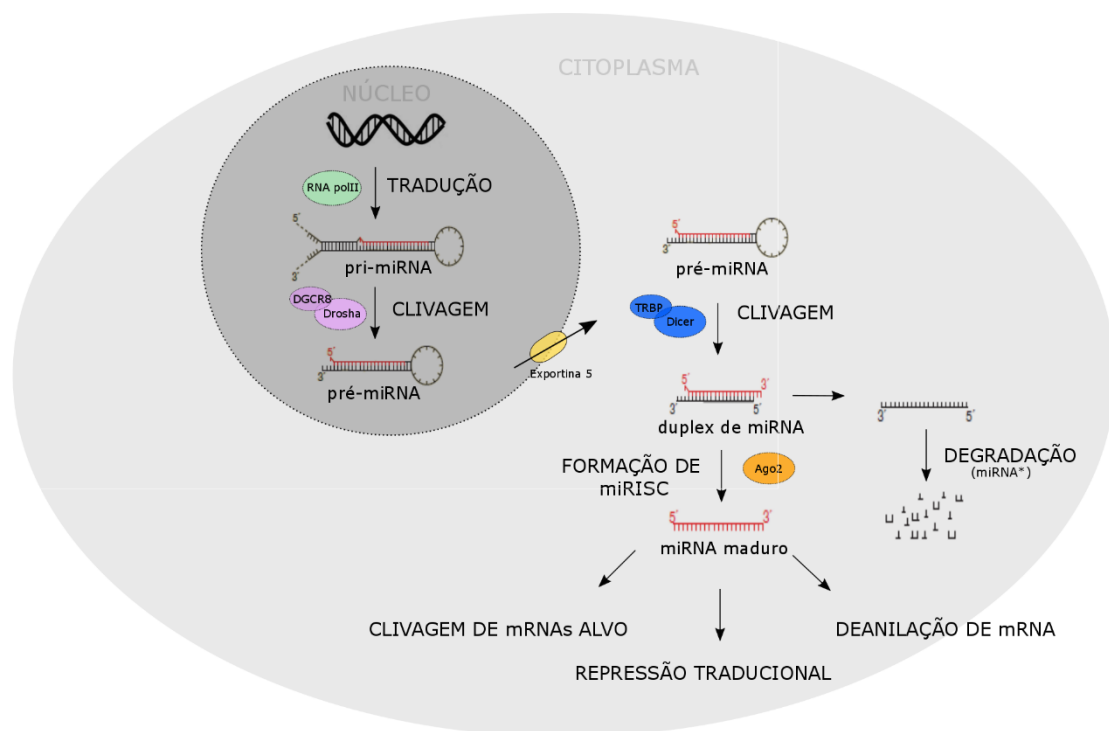


Figura 6. Biogênese e maturação dos miRNAs. O processo canônico de maturação dos miRNAs inclui a produção de um transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II ou III e a clivagem do pri-miRNA pelo complexo formado por Drosha e DGCR8 no núcleo. O pré-miRNA resultante desse processo é exportado para o citoplasma pelo complexo formado por exportina-5. No citoplasma, ocorre a clivagem do pré-miRNA em miRNA maduro pela RNase Dicer. A fita funcional do miRNA maduro é carregada junto à proteína Argonauta no complexo miRISC (complexo de silenciamento induzido por miRNA), onde ela guia miRISC para o silenciamento de mRNAs alvo através de clivagem, repressão traducional ou deânulação do mRNA alvo, enquanto a outra fita do duplex de RNA é degradada. Adaptado de Winter *et al.*, 2009.

Os miRNAs maduros interagem com a proteína argonauta (Ago) para formar o complexo miRISC, e então guiar esse complexo até o mRNA-alvo, preferencialmente até a região 3'UTR, embora experimentos tenham mostrado que o pareamento pode ocorrer ao longo de todo o mRNA (LITTLE *et al.*, 2007; WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015). Essa ligação do miRNA ao mRNA é extremamente dependente de complementaridade de sequência. Sete nucleotídeos na região 5' do miRNA, conhecidos como sequência “seed” são cruciais para a ligação ao mRNA-alvo (LEWIS *et al.*, 2003). A sequência 3' à jusante da sequência *seed*, no entanto, muitas vezes forma pareamentos de base imperfeitos com o alvo, contendo *mismatches*, pareamento de bases GU e saliências (*bulges*, em inglês) (SARAIYA *et al.*, 2013). O grau de complementaridade de sequência entre miRNA-mRNA define se o mRNA vai ser degradado por clivagem proteolítica (perfeita complementaridade entre miRNA-mRNA) ou sofrer repressão traducional (complementaridade parcial) (PAULEY & CHAN, 2008). Em animais, a maioria dos miRNAs se liga na região 3'UTR atuando como repressores traducionais, porém, trabalhos recentes têm apontado outros possíveis mecanismos de regulação gênica pelos miRNAs, como a desestabilização, deamidação, degradação e liberação precoce dos ribossomos (NILSEN, 2007; WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015). Além disso, já foi reportado que em certas situações, como estresse celular e quiescência, certos miRNAs podem ativar a tradução ou desreprimir mRNAs-alvo na presença de certas proteínas (BHATTACHARYYA *et al.*, 2007; VASUDEVAN *et al.*, 2007; OROM *et al.*, 2008; VASUDEVAN, 2011; TRUESDELL *et al.*, 2012).

Surpreendentemente, um mesmo miRNA pode regular positivamente um alvo enquanto regula negativamente outros alvos, como é o caso de miR-145 na diferenciação muscular, que aumenta a expressão de miocardina enquanto diminui a expressão de outros substratos (VASUDEVAN, 2011). Mais interessante ainda é o fato que alguns miRNAs podem exercer efeitos opostos de regulação da tradução de um alvo específico dependendo da extensão do pareamento com o alvo ou da fase do ciclo celular. Saraiya e colaboradores (2013) identificaram que o miRNA miR-3 de *Giardia lamblia* reprime a tradução do mRNA da histona H2A contendo um alvo com pareamento imperfeito ao miRNA, mas aumenta a tradução deste mRNA quando o pareamento ao alvo é totalmente complementar. Em humanos, o miRNA miR-369-3 também demonstrou ter efeitos opostos de regulação da tradução de TNF- α em diferentes fases do ciclo celular, mas essa

regulação também depende de fatores adicionais (VASUDEVAN *et al.*, 2007). A reversibilidade na natureza de regulação pós-transcricional dos miRNAs permite às células que os carregam a responder rapidamente a diferentes condições celulares e consequentemente bloquear desperdícios de energia desnecessários ou manter o estado celular (ORANG *et al.*, 2014). Dessa forma, a regulação de mRNAs-alvo por miRNAs e a forma como essa regulação ocorre parecem ser extremamente complexas, dinâmicas e dependentes de diversos fatores celulares e ambientais ainda não completamente elucidados.

Como identificar alvos para os miRNAs? Enquanto existem centenas de potenciais mRNAs-alvo para cada miRNA, baseado na complementaridade da região *seed* e na energia livre de interação, os princípios reais de reconhecimento de alvos ainda não são completamente conhecidos (WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015). Em plantas, muitos alvos podem ser preditos com confiança simplesmente pela busca de RNAs mensageiros com extensiva complementaridade aos miRNAs. Em animais, por outro lado, extensiva complementaridade com o alvo, levando a clivagem do mesmo, é muito menos usual (BARTEL, 2009). Dessa forma, o desafio da predição de alvos de miRNAs em animais é a busca computacional no genoma que identifique a maioria dos alvos sem trazer também muitos resultados falso-positivos. Atualmente existem disponíveis diversos métodos de predição de alvos de miRNAs baseados em diferentes critérios, como miRanda (BETEL *et al.*, 2008), PITA (KERTESZ *et al.*, 2007), TargetScan (AGARWAL *et al.*, 2015), RNAhybrid (REHMSMEIER *et al.*, 2004), dentre outros; no entanto, nenhum deles é considerado completamente eficiente e uma melhor abordagem para a predição de alvos geralmente envolve o uso de mais de uma ferramenta (RIFFO-CAMPOS *et al.*, 2016).

Além da predição de alvos, ferramentas de bioinformática também possibilitam a predição de novos miRNAs, principalmente a partir da grande quantidade de dados disponíveis com os sequenciamentos de nova geração (NGS). Através dessas ferramentas, miRNAs putativos são preditos em sequências genômicas baseadas em características estruturais de miRNA. Esses algoritmos essencialmente identificam estruturas de *hairpin* em regiões não-codificadoras e não repetitivas do genoma que são características de sequências precursoras de miRNAs. Os miRNAs candidatos são então filtrados por diferentes critérios (LIU *et al.*, 2012). Existem diversos algoritmos disponíveis para a predição de miRNAs, como miRScan (LIM *et al.*, 2003), miRanalyzer (HACKENBERG *et*

al., 2009), miRDeep* (AN *et al.*, 2013) e Mirinho (HIGASHI *et al.*, 2015). Após as predições, técnicas de biologia molecular são frequentemente usadas para confirmação dos miRNAs (LIU *et al.*, 2012).

De forma geral, um único miRNA pode regular centenas de alvos, mesmo que apenas em um grau leve, e reciprocamente, diversos miRNAs podem se ligar a um mesmo mRNA alvo e cooperativamente promover a sua regulação (LIM *et al.*, 2005; KIM & NAM, 2006). Como a complementaridade de sequência com o alvo abrange apenas uma fração do tamanho do miRNA, cada miRNA tem centenas de alvos em potencial, o que os implica em quase todas as rotas biológicas (WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015). Quatro tipos de sítios-alvo com ligação à região *seed* são seletivamente conservados: o sítio 6-mer, que se liga perfeitamente aos seis nucleotídeos do miRNA *seed*; o sítio 7mer-m8, que compreende além da ligação do *seed* um pareamento Watson-Crick do oitavo nucleotídeo do miRNA; o sítio 7mer-A1, que compreende a ligação da região *seed* suplementada por um A (adenina) na posição referente ao primeiro nucleotídeo do miRNA; e o sítio 8-mer, que compreende a ligação da região *seed* suplementada por ambos m8 e A1 (FRIEDMAN *et al.*, 2009). A hierarquia de eficiência dos sítios-alvo de miRNA é 8mer > 7mer-m8 > 7mer-A1 > 6mer. Quando se considera uma região de 7-8 nucleotídeos para reconhecimento do alvo, estima-se que cada família de miRNAs conservada em vertebrados tenha em média 300 alvos conservados, número que pode exceder 400 quando se considera também regiões de seis nucleotídeos para reconhecimento do alvo (6-mer) (BARTEL, 2009). Em suma, mais de 60% dos genes codificadores de proteínas em humanos parecem ser alvos conservados para o reconhecimento e regulação por miRNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Diferentes padrões de expressão de miRNAs são encontrados em diferentes células (LIM *et al.*, 2005), sendo razoável propor que cada tipo celular em cada estágio do desenvolvimento possa ter um padrão de expressão de miRNAs distinto (BARTEL, 2004). Existem evidências de que o impacto de alguns miRNAs sobre seus alvos só pode ser observado em condições celulares muito específicas, como estágios particulares do desenvolvimento, estresse, respostas a condições ambientais e sinalização extracelular, o que dá aos miRNAs a capacidade de regulação fina da expressão gênica (WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015). O efeito de *knockout* de genes de miRNAs frequentemente não é óbvio na observação do fenótipo em condições normais, sendo aparente apenas em certos

contextos celulares ou condições de estresse. Isso acontece pois apenas uma minoria dos miRNAs parece reprimir seus alvos em mais de 50%, sendo que a maior parte deles reprime seus alvos apenas modestamente. Assim, a maioria dos miRNAs não funcionaria como um “interruptor” nos genes, mas estaria mais relacionado à “sintonização” ou ajuste destes, destacando a importância dos miRNAs no microgerenciamento da expressão gênica (BARTEL, 2009; WILCZYNSKA & BUSHELL, 2015).

1.10 – Interações patógeno-hospedeiro mediadas por miRNAs

Durante a infecção, bactéria e hospedeiro são submetidos a mudanças significativas de condições fisiológicas e ambientais às quais eles podem se adaptar ou reagir. Patógenos bacterianos podem ajustar seu metabolismo e desencadear a expressão de genes de virulência, que os ajudam a se beneficiar dos recursos do hospedeiro. Da mesma forma, organismos infectados são capazes de perceber a intrusão de bactérias patogênicas e reagir desencadeando as defesas imunes inata ou adaptativa. A complexa rede de ações e contra-ações que ocorre entre um invasor bacteriano e o organismo infectado é referido como *crosstalk* ou interação patógeno-hospedeiro (DUVAL *et al.*, 2016).

Dentre as diversas mudanças que ocorrem no hospedeiro durante a infecção bacteriana, a que nos desperta maior interesse é o efeito que esses microrganismos causam na expressão de genes e miRNAs. Em 2006, foi publicado o primeiro estudo descrevendo a resposta de um miRNA do hospedeiro a componentes bacterianos. O reconhecimento da flagelina de *Pseudomonas syringae* por *Arabidopsis thaliana* mostrou induzir a expressão de miR-393a e a subsequente inibição da expressão de três receptores de auxina. Isso, por sua vez, diminui a sinalização por auxina, um hormônio vegetal que modula a resposta imune e diminui a suscetibilidade ao agente bacteriano (NAVARRO *et al.*, 2006). Em mamíferos, o envolvimento de miRNAs na resposta imune inata foi investigado através da estimulação de monócitos humanos por LPS e levou à caracterização de miR-146 como um regulador negativo da inflamação (TAGANOV *et al.*, 2006). Seguindo esses estudos, a resposta de miRNAs a infecções bacterianas em mamíferos foi amplamente investigada. Infecções por diferentes patógenos levam a expressão de conjuntos de miRNAs específicos. Dentre eles, miR-155, miR-146, let-7, miR-21 e miR-29 são alguns dos miRNAs que têm papéis importantes na resposta das células hospedeiras a bactérias

(EULALIO *et al.*, 2012; STAEDEL & DARFEUILLE, 2013; MAUDET *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2015). Esses miRNAs regulam as respostas imunes a fim de eliminar a infecção bacteriana, enquanto preservam o organismo dos efeitos deletérios da inflamação (ZENG *et al.*, 2015; DUVAL *et al.*, 2016).

Estudos mostram que os miRNAs estão envolvidos na resposta imune contra infecções tanto de bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas, bem como na resposta a bactérias intra e extracelulares (EULALIO *et al.*, 2012). Os miRNAs mais comumente identificados na resposta a infecções são miR-146 e miR-155 (EULALIO *et al.*, 2012; DUVAL *et al.*, 2016). Ambos os miRNAs são induzidos de maneira dependente de NF- κ B e também exercem regulação sobre essa via, sendo considerados como parte dos mecanismos regulatórios que modulam a produção de citocinas inflamatórias em resposta a estímulos bacterianos (TAGANOV *et al.*, 2006; EULALIO *et al.*, 2012). Em geral, miR-155 tem um efeito sobre as vias de sinalização pró-inflamatórias, enquanto miR-146 desempenha um papel na tolerância imunológica inata, ajudando a manter o balanço da resposta imune (ZENG *et al.*, 2015). Interessantemente, um estudo demonstrou que miR-146 e miR-155 foram encontrados em exossomos após a estimulação de células dendríticas com LPS e ambos foram transferidos com sucesso para as células receptoras, regulando a resposta inflamatória nessas células (ALEXANDER *et al.*, 2015).

As interações patógeno-hospedeiro resultam em modificações fisiológicas e de sinalização nas células hospedeiras que induzem a expressão diferencial e a regulação pós-transcricional mediada por miRNAs de genes envolvidos na resposta imune e em diversas vias celulares (DUVAL *et al.*, 2016; MUXEL *et al.*, 2017). Sendo assim, a identificação simultânea de perfis de miRNA e mRNA fornece uma visão mais abrangente das interações patógeno-hospedeiro durante a infecção e o processo de estabelecimento da doença. Desse modo, além dos esforços para a identificação de miRNAs regulados pela infecção, análises integradas de transcrito e miRNoma de células infectadas com patógenos bacterianos também têm ganhado luz nos últimos anos (SHARBATI *et al.*, 2011; BAO *et al.*, 2015; CASSELLI *et al.*, 2017). No entanto, a identificação de mudanças no perfil transcricional de células suínas submetidas à infecção com *M. hyopneumoniae* ainda não foi investigada.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o que foi apresentado, a investigação de fatores de virulência que ajudem a explicar as diferenças de patogenicidade entre as diferentes espécies e linhagens de *Mycoplasma* que habitam o trato respiratório suíno é um tópico importante que deve ser estudado. Os resultados de Ferrarini e colaboradores (2016) indicam que a produção de peróxido de hidrogênio e o metabolismo de mio-inositol por *M. hyopneumoniae* são fatores que devem colaborar para a patogenicidade aumentada dessa espécie em relação a *M. flocculare* e *M. hyorhinis*, e, desse modo, tornam-se os alvos de investigação do presente trabalho. A patogenicidade elevada de *M. hyopneumoniae* também desperta interesse na relação que esta bactéria mantém com seu hospedeiro durante a infecção. Dessa forma, torna-se interessante traçar um perfil das mudanças transcricionais causadas pela infecção de *M. hyopneumoniae* no hospedeiro, tanto em níveis de mRNAs quanto de miRNAs, a fim de identificar as alterações globais que essa bactéria causa na regulação e na homeostase das células suínas. Além disso, a identificação de miRNAs em exossomos liberados por células infectadas também é uma estratégia pertinente, pois pode ajudar a identificar como essas células se comunicam durante a infecção, além do fato de miRNAs exossomais já terem sido identificados como participantes na regulação da resposta inflamatória (ALEXANDER *et al.*, 2015). A tecnologia de NGS tem a capacidade de traçar a expressão de mRNAs e miRNAs conhecidos com alta resolução e acurácia, além de identificar novos miRNAs e distinguir miRNAs muito similares em sequência (JIN *et al.*, 2014). Sua aplicação se torna o ideal para a análise da expressão diferencial de mRNAs e miRNAs de células suínas infectadas com *M. hyopneumoniae*. Os resultados gerados por essa investigação são muito importantes, pois podem ajudar a identificar formas de interação entre *M. hyopneumoniae* e as células do hospedeiro e, desse modo, contribuir para futuros estudos na busca de alvos de vacinas nessa bactéria que causa um impacto econômico tão grande na suinocultura.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivos gerais

Os objetivos desta tese de doutorado são investigar os mecanismos de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* relacionados ao metabolismo e identificar os efeitos que a infecção com essa bactéria causa na expressão de genes e miRNAs de células suínas.

3.2 – Objetivos específicos

- Identificar se as espécies e linhagens do gênero *Mycoplasma* presentes no trato respiratório suíno são capazes de produzir peróxido de hidrogênio.
- Identificar se a produção de peróxido de hidrogênio por *M. hyopneumoniae* é decorrente do metabolismo de glicerol;
- Analisar a expressão do gene *glpO* em linhagens patogênicas e não-patogênicas de *M. hyopneumoniae*;
- Determinar se *M. hyopneumoniae* é capaz de captar e utilizar o mio-inositol presente no meio de cultura como fonte de energia;
- Identificar mRNAs e miRNAs diferencialmente expressos em células suínas infectadas com *M. hyopneumoniae*;
- Fazer a predição de alvos para os miRNAs diferencialmente expressos na condição de infecção;
- Identificar as funções celulares dos genes afetados pela infecção e, se possível, correlaciona-las às funções dos alvos de miRNAs diferencialmente expressos;
- Analisar se exossomos de células suínas podem alterar o crescimento de micoplasmas do trato respiratório suíno;
- Investigar se *M. hyopneumoniae* é capaz de internalizar exossomos adicionados ao meio de cultura.

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão organizados em três capítulos, dos quais os dois primeiros são apresentados na forma de artigos científicos.

Os capítulos estão organizados da seguinte forma:

- **Capítulo 1:** Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- **Capítulo 2:** *Mycoplasma hyopneumoniae* elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells.
- **Capítulo 3:** Avaliação do efeito de exossomos no cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

4.1 – Capítulo 1:

Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Mariana Galvão Ferrarini^{1,2,3*}, Scheila Gabriele Mucha^{3*}, Delphine Parrot⁴, Guillaume Meiffren⁴, José Fernando Ruggiero Bachega^{3,5}, Gilles Comte⁴, Arnaldo Zaha^{3§}, Marie-France Sagot^{1,2§}

¹ ERABLE Team, Institut Nationale de Recherche en Informatique et Automation, Villeurbanne, France.

² Laboratoire de Biometrie et Biologie Evolutive, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France.

³ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴ Centre d'Etude des Substances Naturelles, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France.

⁵ Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

* Authors contributed equally to this work.


§Correspondence authors: zaha@cbiot.ufrgs.br; marie-france.sagot@inria.fr

Artigo publicado na revista *Molecular Microbiology*.

O artigo está completamente reproduzido a seguir, com a numeração original das páginas mantidas. O material suplementar pode ser encontrado *online* no link:

<https://onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fmmi.13957&file=mmi13957-sup-0001-supinfo1.pdf>

Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mariana Galvao Ferrarini ^{1,2,3†}
Scheila Gabriele Mucha,^{3†} Delphine Parrot,^{1,2}
Guillaume Meiffrein,⁴
Jose Fernando Ruggiero Bachega,^{3,5}
Gilles Comte,⁴ Arnaldo Zaha^{3*} and
Marie-France Sagot^{1,2*}

¹ERABLE Team, Institut Nationale de Recherche en Informatique et Automatique, Villeurbanne, France.

²Laboratoire de Biometrie et Biologie Evolutive, Universite Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France.

³Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴Centre d'Etude des Substances Naturelles, Universite Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France.

⁵Departamento de Farmacociencias, Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Summary

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of enzootic pneumonia. In our previous work, we reconstructed the metabolic models of this species along with two other mycoplasmas from the respiratory tract of swine: *Mycoplasma hyorhinis*, considered less pathogenic but which nonetheless causes disease and *Mycoplasma flocculare*, a commensal bacterium. We identified metabolic differences that partially explained their different levels of pathogenicity. One important trait was the production of hydrogen peroxide from the glycerol metabolism only in the pathogenic species. Another important feature was a pathway for the metabolism of myo-inositol in *M. hyopneumoniae*. Here, we tested these traits to understand their relation to the different levels of pathogenicity, comparing not only the species but also pathogenic and attenuated

strains of *M. hyopneumoniae*. Regarding the myo-inositol metabolism, we show that only *M. hyopneumoniae* assimilated this carbohydrate and remained viable when myo-inositol was the primary energy source. Strikingly, only the two pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* produced hydrogen peroxide in complex medium. We also show that this production was dependent on the presence of glycerol. Although further functional tests are needed, we present in this work two interesting metabolic traits of *M. hyopneumoniae* that might be directly related to its enhanced virulence.

Introduction

The notion that the lungs are sterile is frequently stated in textbooks; however, no modern studies have provided evidence for the absence of microorganisms in this environment (Dickson and Huffnagle, 2015). Several bacteria colonize the respiratory tract of swine. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyorhinis* are some of the most important species identified so far (Mare and Switzer, 1965; Meyling and Friis, 1972; Rose *et al.*, 1979; Siqueira *et al.*, 2017).

M. hyopneumoniae is widespread in pig populations and is the causative agent of enzootic pneumonia (Maes *et al.*, 1996); *M. hyorhinis*, although not as pathogenic as *M. hyopneumoniae*, has already been found as the sole causative agent of pneumonia, polyserositis and arthritis in pigs (Kobisch and Friis, 1996; Davenport *et al.*, 1970; Thacker *et al.*, 2012; Whittlestone, 2012). *M. flocculare*, on the other hand, has high prevalence in swine herds worldwide, but up to now, is still considered a commensal bacterium (Kobisch and Friis, 1996).

Because of the genomic resemblance of these three *Mycoplasma* species (Stemke *et al.*, 1992; Siqueira *et al.*, 2013), it remains unclear why *M. hyopneumoniae* can become highly virulent if compared with the other two. It is also essential to understand that the simple presence or absence of each species is not in itself a determinant factor in the development of enzootic

Accepted 22 March, 2018. *For correspondence. E-mail zaha@cbiot.ufrgs.br; Tel. +55 51 3308 6054; Fax +55 51 3308 7309. or E-mail marie-france.sagot@inria.fr; Tel. +33 4 72 44 82 38; Fax +33 4 72 43 13 88. †These authors contributed equally to this work

pneumonia: most piglets are thought to be vertically infected with *M. hyopneumoniae* at birth (Maes *et al.*, 1996; Fano *et al.*, 2006; Sibila *et al.*, 2009) and many can become carriers of the pathogen throughout their entire life without developing acute pneumonia. Moreover, *M. hyopneumoniae* also persists longer in the respiratory tract, either in healthy animals or even after successful treatment of the disease (Thacker *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2002; Fano *et al.*, 2005; Overesch and Kuhnert, 2017).

To make it even more complex, different strains of each species bear different levels (or even lack) of pathogenicity. For instance, *M. hyopneumoniae* has six sequenced strains, two of which are known to be attenuated by culture passages (Zielinski and Ross, 1990; Liu *et al.*, 2013). These strains cannot cause the clinical symptoms of pneumonia *in vivo* and up to now it is not clear why.

In contrast to other pathogenic bacteria, and as revealed by the analysis of the sequenced genomes from several mycoplasmas (Himmelreich *et al.*, 1996; Chambaud *et al.*, 2001; Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2013), pathogenic *Mycoplasma* species seem to lack typical primary virulence factors such as toxins, invasins and cytolysins (Pilo *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2017). For this reason, classical concepts of virulence genes are usually problematic and a broader concept for virulence is used for these species. In this way, a virulence gene in mycoplasmas is described as any nonessential gene for *in vitro* conventional growth, which is essential for the optimal survival (colonization, persistence or pathology) inside the host (Browning *et al.*, 2014).

There have been many different types of virulence factors described so far in several *Mycoplasma* species, most of them related to adhesion (Razin and Jacobs, 1992), invasion (Sibille *et al.*, 2015), cytotoxicity (Vilei and Frey, 2001; Hames *et al.*, 2009), host-evasion (Simmons and Dybvig, 2007) and host-immunomodulation (Katz *et al.*, 1983; Waites and Talkington, 2004). As for *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*, adhesion factors such as antigen surface proteins and the ability of these organisms to produce a capsular polysaccharide have already been described in the literature (Tajima and Yagihashi, 1982; Citti *et al.*, 1997; Djordjevic *et al.*, 2004; Seymour *et al.*, 2012; Whittlestone, 2012).

However, while the diseases caused by these swine mycoplasmas have been extensively studied, only recently their metabolism has been explored from a mathematical and computational point of view by our group (Ferrarini *et al.*, 2016). We are well aware that metabolism does not fully explain the pathologies caused by either of them. However, adhesion proteins, classically related to virulence in mycoplasmas cannot

be associated with the different levels of pathogenicity between *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*. Both species harbor similar sets of adhesion proteins (Siqueira *et al.*, 2014) and have been shown to adhere to cilia in a similar way (Young *et al.*, 2000). Thus, it remains unclear what prevents *M. flocculare* to cause disease in this context.

In our previous work (Ferrarini *et al.*, 2016), we compared the reconstructed metabolic models of these three *Mycoplasma* species, and pointed out important metabolic differences that could partly explain the different levels of pathogenicity between the three species. The most important trait was related to the glycerol metabolism, more specifically the turnover of glycerol-3-phosphate into dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) by the action of glycerol-3-phosphate oxidase (GlpO, EC 1.1.3.21), which was only present in the genomes of *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae*. This would allow the usage of glycerol as a primary energy source, with the production of highly toxic hydrogen peroxide in the presence of molecular oxygen. The metabolism of glycerol and the subsequent production of hydrogen peroxide by the action of GlpO are essential for the cytotoxicity of lung pathogens *Mycoplasma pneumoniae* (Hames *et al.*, 2009) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Vilei and Frey, 2001). Moreover, the *Mycoplasma hominis* group is not the only one where hydrogen peroxide production via *glpO* has been reported. In some *Spiroplasma* species (specifically *Spiroplasma taiwanense*) and within the pneumoniae group (for instance in *Mycoplasma penetrans*), the presence of this enzyme was also associated with virulence (Kannan and Baseman, 2000; Lo *et al.*, 2013).

Another major difference between our previous models was related to the presence of a complete transcriptional unit (TU) encoding proteins for the uptake and metabolism of myo-inositol in *M. hyopneumoniae* (with the exception of one enzyme). This could be another important trait for the enhanced virulence of this species if compared with the other two. Here, we studied this pathway in more detail to try to find this missing enzyme and the possible reasons as to why natural selection kept these genes only in this *Mycoplasma* species.

In a recent review, Maes *et al.* (2017) emphasize the need for the further investigation of the role of glycerol and myo-inositol metabolism and their contribution to virulence in *M. hyopneumoniae*. Here, we experimentally tested these two traits to show how they might be related to the different levels of pathogenicity, by comparing not only the species themselves but different strains of *M. hyopneumoniae*. Contrary to what we anticipated, only the two pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* were able to produce hydrogen peroxide in

complex medium, and we confirmed that this production was dependent on the presence of glycerol. The myo-inositol metabolism, in turn, was tested with the aid of deuterated myo-inositol in Friis medium. We were able to detect by mass spectrometry (MS) a slight decrease in the marked myo-inositol concentration throughout time, indicating the ability of *M. hyopneumoniae* to uptake such carbohydrate. We also show here that only the *M. hyopneumoniae* strains remained viable when myo-inositol was the primary energy source.

We present here two metabolic traits specific to *M. hyopneumoniae* that might be directly related to its enhanced virulence, especially in its ability to successfully overgrow the other two *Mycoplasma* species in the respiratory tract of swine, persist longer in this environment and possibly cause disease.

Results

Comparative genomics of *glpO* from glycerol metabolism

Highly conserved homolog genes to *glpO* from *M. mycoides* subsp. *mycoides* (EC 1.1.3.21) were found only in the genomes of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*. Despite the annotation as a dehydrogenase in both *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*, we propose this enzyme to act as glycerol-3-phosphate oxidase (GlpO), using molecular oxygen as the final electron acceptor and producing DHAP and hydrogen peroxide. We therefore refer to the encoded protein in *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* as GlpO, rather than GlpD. The high similarity between these predicted proteins (Supporting Information Fig. S1A) may be an indication that this trait might be essential for the pathogenicity of these *Mycoplasma* species.

Particularly, the cytotoxicity of *M. mycoides* subsp. *mycoides* is considered to be related to the translocation of the hydrogen peroxide into the host cells (Bischof *et al.*, 2008). This is presumably possible because of the close proximity to the host cells along with the integral membrane GlpO (Pilo *et al.*, 2005, 2007). Different transmembrane prediction softwares (Hofmann, 1993; Combet *et al.*, 2000; Krogh *et al.*, 2001; Kahsay *et al.*, 2005) identified putative transmembrane portions in the GlpO proteins from *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* (Supporting Information Fig. S1B). Similar results were reported for the homolog enzyme in *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Pilo *et al.*, 2005), and a recent proteomic study has detected GlpO from *M. hyopneumoniae* in surface-enriched extracts through LC-MS/MS (Personal communication from H. B. Ferreira, (Machado *et al.*, 2018).

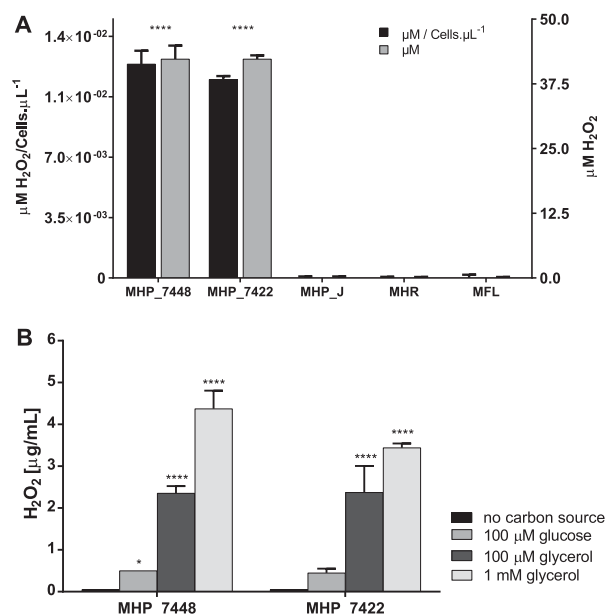


Fig. 1. Hydrogen peroxide production by swine mycoplasmas. A. In Friis medium after bacterial growth: Hydrogen peroxide was only detected in growth media from pathogenic strains (field isolates) of *M. hyopneumoniae* 7448 (MHP_7448) and 7422 (MHP_7422). Neither the attenuated strain J (MHP_J) nor the other species *M. hyorhinis* (MHR) and *M. flocculare* (MFL) produced detectable amounts of this toxic product. The concentration was also standardized based on the average number of cells from each culture. Data are presented as mean and standard deviation of three independent samples and statistical analysis was performed considering *M. flocculare* as a control strain (since it lacks the *glpO* gene). B. In the presence of different carbon sources: Pathogenic *M. hyopneumoniae* strains were used to test hydrogen peroxide production in incubation buffer supplemented with either glycerol or glucose after 2 h of incubation. Both strains were able to produce significant amounts of the toxic product when glycerol was present. Data are represented as mean and standard deviation of four independent samples (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

Pathogenic *M. hyopneumoniae* strains produce hydrogen peroxide from glycerol

Contrary to what we had anticipated, we were only able to detect the production of hydrogen peroxide from the two pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* (7448 and 7422) in Friis medium, as can be seen in Fig. 1A. The attenuated strain from the same species (*M. hyopneumoniae* strain J), along with *M. hyorhinis* and *M. flocculare* did not produce detectable quantities of this toxic product. In order to verify if the amount of hydrogen peroxide produced was comparable between strains, we also counted the number of cells for each replicate. In this way, the two pathogenic strains produced approximately the same amount of hydrogen peroxide and had cell counts of the same order of magnitude (available in Supporting Information Table S1).

We also show (Fig. 1B) that the hydrogen peroxide produced by the *M. hyopneumoniae* strains 7448 and

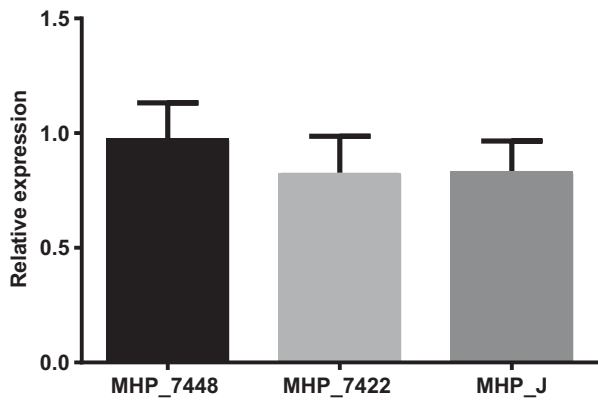


Fig. 2. Expression levels of *glpO* gene in *M. hyopneumoniae* strains.

We did not find any significant difference on the transcript levels of *glpO* from all tested strains. Bars show the average relative quantification normalized against unit mass (500 ng of total RNA) and replicate 2 from strain 7448 was used as the calibrator. Average expression levels were calculated with independent biological triplicates ($p < 0.05$).

7422 was dependent on the presence of glycerol in the incubation buffer.

Levels of *glpO* transcripts do not differ from pathogenic to attenuated strains of *M. hyopneumoniae*

We tested the three *M. hyopneumoniae* strains (7448, 7422 and J) in order to compare the mRNA expression levels of *glpO* gene by RT-qPCR. Since the transcript levels of normalizer genes were not comparable between strains, we used relative quantification normalized against unit mass; in our case, the initial amount of RNA. We chose one of the replicates from strain 7448 as the calibrator, and we were able to show (Fig. 2 and

Supporting Information Table S2) that there was no significant difference in the transcript levels of *glpO* in all tested strains from *M. hyopneumoniae*.

Enzymes for the uptake and catabolism of myo-inositol are specific to *M. hyopneumoniae* strains

M. hyopneumoniae is the only reported species among the Mollicutes that contains genes involved in the catabolism of myo-inositol. Since *Mycoplasma* species seem to maintain a minimum set of essential metabolic capabilities, we decided to further investigate this pathway and the influence of its presence on the metabolism and pathogenicity of *M. hyopneumoniae*. The degradation of inositol can feed glycolysis with DHAP and also produces an acetyl coenzyme-A (AcCoA) (Fig. 3). A TU for the myo-inositol catabolism is present in all *M. hyopneumoniae* strains, with the exception of the gene that codes for the enzyme 6-phospho-5-dehydro-2-deoxy-D-gluconate aldolase (IoIJ, EC 4.1.2.29), responsible for the turnover of 6-phospho-5-dehydro-2-deoxy-D-gluconate (DKGP) into malonate semialdehyde (MSA).

The gene encoding IoIJ in other organisms is similar to the one coding for enzyme fructose-bisphosphate aldolase (Fba) from glycolysis (EC 4.1.2.13). There are two annotated copies of the gene *fba* in *M. hyopneumoniae* (*fba* and *fba-1*, Supporting Information Table S3). We performed homology and gene context analyses (with the use of the MGcV software (Overmars *et al.*, 2013)), 3D comparative modelling and protein-ligand interaction analysis to check if either of them would be a suitable candidate for this activity.

The gene context and protein sequence alignment for 15 selected Fba homologs in Mollicutes can be seen in

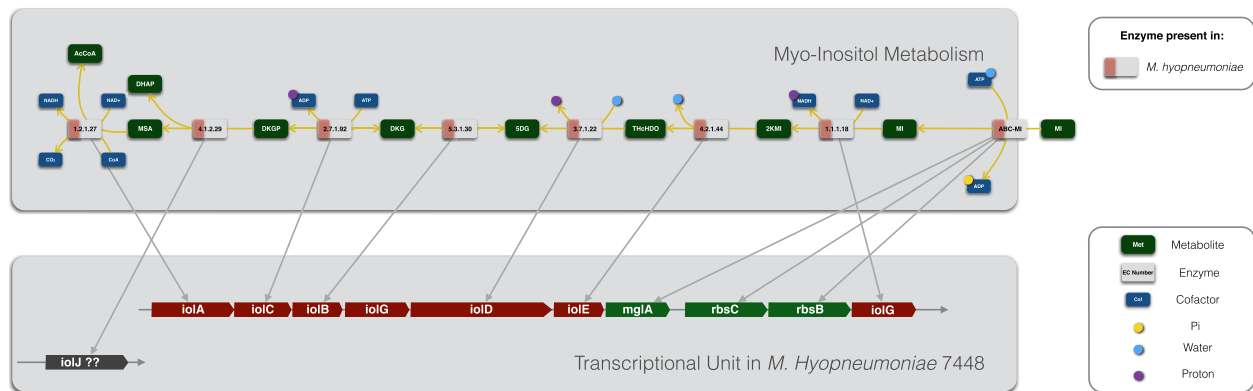


Fig. 3. Myo-inositol catabolism pathway in all *M. hyopneumoniae* strains and its transcriptional unit in *M. hyopneumoniae* strain 7448.

Metabolites are depicted in dark green and enzymatic activities present in *M. hyopneumoniae* can be seen in pink. Metabolite abbreviations are as follows: MI (myo-inositol), 2KMI (2-keto-myo-inositol), THChDO (3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione), 5DG (5-deoxy-D-glucuronate), DKG (2-deoxy-5-dehydro-D-gluconate), DKGP (6-phospho-5-dehydro-2-deoxy-D-gluconate), MSA (malonate semialdehyde), AcCoA (acetyl coenzyme-A), DHAP (dihydroxyacetone phosphate). EC 1.2.1.27: MSA dehydrogenase; EC 4.1.2.29: DKGP aldolase; EC 2.7.1.92: DKG kinase; EC 5.3.1.30: 5DG isomerase; EC: 3.7.1.22: THChDO hydrolase; EC 4.2.1.44: Myo-inosose-2 dehydratase; EC 1.1.1.18: MI-2-dehydrogenase; ABC-MI: ABC transporter for myo-inositol.

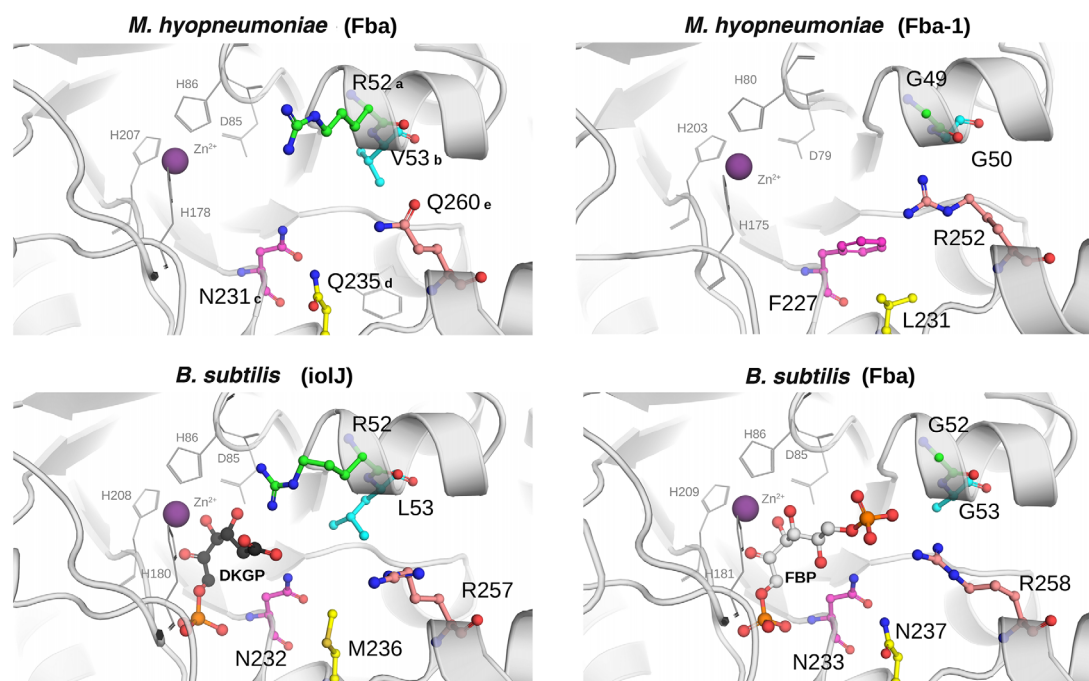


Fig. 4. Substrate cavity prediction for Fba and Fba-1 from *M. hyopneumoniae* strain 7448. Cavities from the comparative models of Fba and Fba-1 from *M. hyopneumoniae* in comparison to the models constructed for Fba and lolJ from *B. subtilis*. The specificity for DKGP in lolJ seems to be strongly associated to the presence of a conserved arginine in position 'a' (R52 in Fba-1 from *M. hyopneumoniae*). In contrast, Fbas generally bear glycines in this position (for complete explanation see Supporting Information Figs S3 and S4). While Fba-1 from *M. hyopneumoniae* resembles more the experimentally solved Fba enzymes from *B. subtilis*, *E. coli* and *G. intestinalis*, the predicted structure of Fba from *M. hyopneumoniae* is more similar to the lolJ structure from *B. subtilis*.

Supporting Information Figs S2 and S3. Comparative models for both copies of Fba from *M. hyopneumoniae* and previously characterized lolJ and Fba from *Bacillus subtilis* (Yoshida *et al.*, 2008) were constructed based on available structures of Fba in PDB (Berman *et al.*, 2000) (Fig. 4 and Supporting Information Table S4). Fba structures from *Escherichia coli* and *Giardia intestinalis* were used to gather more information about substrate binding (Supporting Information Fig. S3). The alignment shows a highly conserved zinc binding site (residues marked as '*'), essential for substrate binding and catalysis. Positions 'a', 'b', 'c', 'd' and 'e' surround the substrate cavity. The structural analysis suggests that the interaction mode of DKGP (substrate of lolJ) with the zinc ion of the active site is similar to that observed for FBP (fructose-1,6-bisphosphate, substrate of Fba). Nevertheless the substrate specificity is strongly dependent on the residues that form the substrate cavity.

While there seems to be several common features between Fba and lolJ (residues 'c', 'd', 'e' and '*'), residue 'a' appears to be essential for the substrate interaction with lolJ. This residue is generally occupied by an arginine (R52) in several putative lolJs from other organisms (Supporting Information Fig. S4), and absent in all predicted Fbas analysed in this study. From the

predicted structures, the presence of this positively charged arginine in lolJ seems to disfavour the interaction with the phosphate group of FBP whilst it is complementary to the carboxyl group from DKGP.

In this way, the predicted structure of Fba-1 from *M. hyopneumoniae* resembles more the Fba structures from the experimentally solved Fbas in *B. subtilis*, *E. coli* and *G. intestinalis*. The annotated Fba from *M. hyopneumoniae*, on the other hand, seems to be more similar to the lolJ structure from *B. subtilis*. Although functional studies are needed to test this hypothesis, we propose that all enzymes needed for the myo-inositol catabolism are present in *M. hyopneumoniae*.

M. hyopneumoniae is able to uptake myo-inositol from the culture medium

In order to ascertain the ability of different bacteria to uptake myo-inositol, we used two different approaches. The first was the use of marked myo-inositol in complex medium and analysis by MS, and the second was to check the viability of cells (through ATP production) whenever myo-inositol was used as primary energy source.

When we tested if cells were able to uptake the marked myo-inositol, over the course of 48 h, we found

no significant difference in *M. flocculare* and *M. hyorhinis* when compared to the control medium (CTRL), as observed in Fig. 5A. As expected, the concentrations of myo-inositol for both strains of *M. hyopneumoniae* after 48 h of growth were lower than the control medium. We also collected two extra time points for *M. hyopneumoniae* strain 7448 and CTRL: 8 h and 24 h of growth (Fig. 5B). In all time points, there is significant difference between the residual marked myo-inositol and the control medium, which implies that *M. hyopneumoniae* is able to uptake such carbohydrate from the medium. MS peak data is available in Supporting Information Table S5.

Since we had glucose and glycerol present in this complex medium analysed by MS, we also wanted to check if the viability of the different strains and species altered when myo-inositol was the primary energy source. For this, we incubated cells in myo-inositol

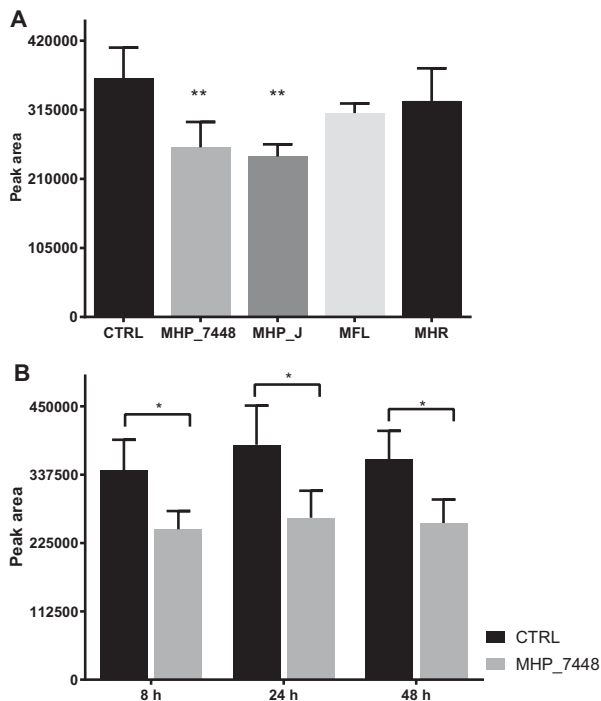


Fig. 5. Deuterated myo-inositol-1,2,3,4,5,6- d_6 uptake in complex medium.

A. Comparison after 48 h of growth of *M. hyopneumoniae* J ATCC 25934 (MHP_J) and field isolate 7448 (MHP_7448), *M. flocculare* ATCC 27716 (MFL) and *M. hyorhinis* ATCC 17981 (MHR). While there is no significant difference in the concentrations between MFL and MHR and the control medium (CTRL), both *M. hyopneumoniae* strains seem to be able to uptake myo-inositol. B. We also collected two extra time points for MHP_7448 and CTRL: 8 h and 24 h of growth. In all time points there is significant difference between residual marked myo-inositol and the control medium. Data are presented as mean and standard deviation of four independent biological replicates. Asterisks indicate statistically significant differences in residual marked myo-inositol (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

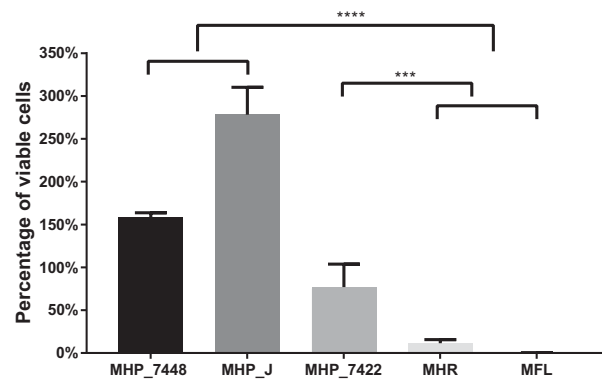


Fig. 6. Viability of *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* after 8 hours of incubation in myo-inositol defined medium.

The viability of cells in myo-inositol defined medium was measured by ATP production in comparison to inoculation in regular defined medium (glucose-containing medium). Data are represented as the ratio between ATP production in each media. There is a significant decrease of ATP production in *M. hyorhinis* and *M. flocculare* whereas at least 75% of the cells from *M. hyopneumoniae* remained viable after cultivation in the myo-inositol defined medium (** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

defined medium (depleted with glucose and glycerol) for 8 hours and measured the amount of ATP these cells were able to produce. This in turn was directly related to the amount of viable cells after cultivation in the specific medium tested. Considering we do not know the energetic yield and efficiency of each strain and species, we could not directly compare the amount of ATP produced between different organisms. For this reason, growth in regular defined medium (with glucose) for each strain was used as a normalization control and the ratio of ATP production in both media was used to compare the viable cells between strains. Since there was no other energy source available in the medium and in accordance with our previous predictions and results, only *M. hyopneumoniae* cells remained viable (ranging from 75% to 280%) when compared to their control growth in the regular defined medium (Fig. 6 and Supporting Information Table S6). The viability of the other species in this medium was 11.5% for *M. hyorhinis* and 0.2% for *M. flocculare*. We also achieved similar results when comparing the growth in myo-inositol defined medium versus Friis medium (Supporting Information Fig. S5).

Discussion

In this study, we wanted to find possible differences between pathogenic and attenuated strains of *M. hyopneumoniae* and also compare them with *M. hyorhinis* and *M. flocculare* and assess possible links to the enhanced virulence of *M. hyopneumoniae*. While *M. hyopneumoniae* strains 7422 and 7448 are considered

pathogenic, strain J became attenuated after serial passages of *in vitro* culture; *M. hyorhinis* strain ATCC 17981 was isolated from swine but, to our knowledge, its level of pathogenicity has not been tested *in vivo*; and even though *M. flocculare* is not considered pathogenic, strain ATCC 27399 was isolated from a case of swine pneumonia (strain ATCC 27716 is derived from this strain). In our previous study (Ferrarini *et al.*, 2016), through mathematical modelling, we predicted two traits of *M. hyopneumoniae in silico* that could be associated with its enhanced virulence: the myo-inositol catabolism and the link between the glycerol and the glycolysis metabolism, with the production of highly toxic hydrogen peroxide (by the activity of the GlpO enzyme). In this work, we tested whether these species indeed differed from each other regarding their ability (i) to produce hydrogen peroxide *in vitro* and whether this was related to the availability of glycerol, (ii) to uptake myo-inositol and (iii) to remain viable in a defined medium with myo-inositol as the primary energy source. While the uptake of myo-inositol might be a general feature of *M. hyopneumoniae*, the production of hydrogen peroxide in complex medium seems to be specific to pathogenic strains of this species.

Glycerol metabolism and hydrogen peroxide production

Even though the GlpO enzyme was previously detected in proteomes from both pathogenic and attenuated strains of *M. hyopneumoniae* (232 and J) (Pinto *et al.*, 2009; Pendarvis *et al.*, 2014), only the pathogenic strains tested in our study (7448 and 7422) were able to produce detectable amounts of hydrogen peroxide in Friis medium (Fig. 1). To our knowledge, no other study up to now was able to show that *M. hyopneumoniae* strains were able to produce this toxic product *in vitro* (Maes *et al.*, 2017). We also show here that the production of hydrogen peroxide in the pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* is dependent on the presence of glycerol (Fig. 1B).

The metabolism of glycerol and the formation of hydrogen peroxide were described as essential for the cytotoxicity of lung pathogens *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Vilei and Frey, 2001) and *M. pneumoniae* (Hames *et al.*, 2009). Moreover, although both *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* can adhere to the cilia of tracheal epithelial cells in a similar way, only the adhesion of *M. hyopneumoniae* causes tissue damage (Young *et al.*, 2000).

We showed that the difference in enzyme activity was not related to the expression levels of *glpO* gene from the strains tested (Fig. 2). We did not find any extreme differences in their aminoacid sequences either (Supporting Information Fig. S3). This could be an indication

that either this enzyme undergoes post-translational modifications in order to be active and/or the availability of the substrate (glycerol) intracellularly might be a limiting step for its activity. Post-translational modifications have been extensively reported experimentally in several proteins of *M. hyopneumoniae* (Djordjevic *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2007; Seymour *et al.*, 2010; Tacchi *et al.*, 2016). From transcriptomic and proteomic literature data, we were not able to find any enlightening differences in this pathway between strains or species (Supporting Information Table S7).

As for the availability of intracellular glycerol, in our previous metabolic models, we predicted differences in the metabolism of glycerol among the three *Mycoplasma* species (Supporting Information Fig. S6). While *M. hyopneumoniae* has five different ways of uptaking glycerol (dehydrogenation of glyceraldehyde, ABC transport of glycerol and glycerol-phosphate, import of glycerophosphoglycerol and glycerophosphocholine), the other two species lack at least two reactions. This might also limit the rate of production of hydrogen peroxide in each species. In this way, the enhanced pathogenicity of *M. hyopneumoniae* over *M. hyorhinis* and *M. flocculare* may therefore also be due to hydrogen peroxide formation resulting from a higher uptake of glycerol as an energy source. Similarly, one reason that could partially explain why *M. mycoides* subsp. *mycoides* is highly pathogenic in comparison with the less pathogenic *M. pneumoniae* might be the greater intracellular availability of glycerol due to the presence of a specific and very efficient ABC transporter in *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Hames *et al.*, 2009).

Since the production of hydrogen peroxide was not reported as essential to the *in vivo* virulence of *Mycoplasma gallisepticum* (Szczepanek *et al.*, 2014), more studies are needed to better understand the importance of this metabolism in *M. hyopneumoniae*. Moreover, future biochemical and functional studies are needed to prove that GlpO is indeed responsible for the activity proposed here and to check if the enzyme in attenuated strains/species is functional.

Myo-inositol uptake and catabolism

M. hyopneumoniae is the only *Mycoplasma* species with sequenced genome that has the genes for the catabolism of myo-inositol. Myo-inositol is an essential precursor for the production of inositol phosphates and inositol phospholipids in all eukaryotes (Gonzalez-Salgado *et al.*, 2012). Myo-inositol is also widespread in the bloodstream of mammals (Reynolds, 2009), which would make it a suitable energy source for bacteria in the extremely vascularized respiratory system. Previously, *Mycoplasma iguanae* was described to produce

acid from inositol (Brown *et al.*, 2006), but the methods used in that paper are not clear and there is no complete genome from this organism for us to draw any conclusions. Based on sequence homology, orthology, synteny and tridimensional analyses, we proposed a possible candidate for the missing enzyme lolJ in *M. hyopneumoniae*, namely a duplication of the *fb*a gene from glycolysis. This functional divergence after duplication is particularly interesting in bacteria for which evolution was mostly driven by genome reduction. Another reported example of this event is the duplication of the *trmFO* gene in *Mycoplasma capricolum* and more recently in *Mycoplasma bovis*. The duplicated TrmFO in *M. capricolum* was reported to catalyze the methylation of 23S rRNA (Lartigue *et al.*, 2014) while the duplicated copy in *M. bovis* has been described to act as a fibronectin-binding adhesin (Guo *et al.*, 2017).

We showed here that *M. hyopneumoniae* was able to uptake marked myo-inositol from a complex culture medium (Fig. 5); in addition this was the only species that remained viable whenever myo-inositol was used as the primary energy source (Fig. 6). From our metabolic model predictions (Ferrarini *et al.*, 2016), the use of myo-inositol would be much more costly than the uptake and metabolism of glucose, which corroborates the small uptake of myo-inositol in Friis medium (glucose-rich) (Fig. 5). This basal uptake of myo-inositol could also be an indication that this pathway is important not only for energetic yield. Supporting this idea, microarray studies on strain 232 showed that several genes (if not all) from the myo-inositol catabolism were differentially expressed during stress treatments: heat shock (downregulated) (Madsen *et al.*, 2006), iron depletion (upregulated) (Madsen *et al.*, 2006) and nor-epinephrine (downregulated) (Oneal *et al.*, 2008). Moreover, a previous transcriptome profiling of *M. hyopneumoniae* (Siqueira *et al.*, 2014) showed that all genes from the myo-inositol catabolism were transcribed under normal culture conditions. Furthermore, three genes from the pathway (*iolB*, *iolC* and *iolA*) belonged to the list of the 20 genes with the highest number of transcript reads. Besides the transcription of these genes, proteomic studies of *M. hyopneumoniae* strains 232 (Pendarvis *et al.*, 2014), 7422, 7448 and J (Pinto *et al.*, 2009; Reolon *et al.*, 2014) (Supporting Information Table S7) showed that several enzymes from this pathway were present in normal culture conditions.

Indeed, myo-inositol has been extensively reported in several organisms as a signaling molecule (Downes and Macphee, 1990; Gillaspay, 2011). Moreover, the myo-inositol catabolism has been experimentally described as a key pathway for competitive host nodulation in the plant symbiont and nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti* (Kohler *et al.*, 2010). Host nodulation is

a specific symbiotic event between a host plant and a bacterium. Kohler *et al.* (2010) showed that whenever inositol catabolism is disrupted (by single gene knock-outs from the inositol operon), the mutants are outcompeted by the wild type for nodule occupancy. This means that genes for the catabolism of inositol are required for a successful competition in this particular symbiosis. Moreover, the authors were not able to find a suitable candidate for the lolJ activity. In our case, we proposed that the activity of the missing enzyme lolJ is taken over by a duplication of *fb*a. We were able to find a similar duplication (also not inside the myo-inositol cluster) in the genome of *S. meliloti* 1021 (SM_b21192 and SM_b20199, both annotated as fructose-bisphosphate-aldolase, EC 4.1.2.13). This means that in at least one other symbiont that has the myo-inositol catabolism genes, there could exist a putative lolJ not close to the myo-inositol cluster, just as we proposed here.

Whether this entire pathway is functional in *M. hyopneumoniae* is yet to be tested and further experiments should take place to support this hypothesis. However, the ability of *M. hyopneumoniae* to persist longer in the swine lung if compared to the other two mycoplasmas might come from the fact that this species is able to uptake and process myo-inositol. Furthermore, the ability of *M. hyopneumoniae* to grow in diverse sites (Le Carrou *et al.*, 2006) if compared to *M. flocculare* might also be due to this specific trait.

Concluding remarks

It is important to remember that even though *M. hyopneumoniae* is considered highly pathogenic, the three *Mycoplasma* species studied here are widespread in pig populations and can easily be found in healthy hosts (Fano *et al.*, 2005; Pieters *et al.*, 2010). However, the main question permeating this fact is: what causes the switch from a nonpathogenic *Mycoplasma* community to a pathogenic one? And what makes some strains pathogenic while others inflict no harm to the host cells?

Some strains of *M. hyopneumoniae* become less pathogenic in broth culture and, after serial passages, they lose their ability to produce gross pneumonia in pigs (Whittlestone, 2012). In a proteomic study comparing strains 232 and J, researchers have described that the attenuated strain J switches its focus to metabolism and therefore has developed better capabilities to profit from the rich culture medium while the ability to infect host cells becomes less important so that adhesion-related genes are downregulated (Li *et al.*, 2009). This might be related to the fact that here we detected a higher production of ATP in this attenuated strain when

compared to the pathogenic strains 7448 and 7422. Liu *et al.* (2013) have investigated genetic variations between *M. hyopneumoniae* strains 168 and attenuated 168-L and found out that almost all reported *Mycoplasma* adhesins were affected by mutations. Tajima and Yagihashi (1982) reported that capsular polysaccharides from *M. hyopneumoniae* play a key role in the interaction between pathogen and host. Indeed in several bacterial species it has been reported that the amount of capsular polysaccharide is a major factor in their virulence (Corbett and Roberts, 2009) and it decreases significantly with *in vitro* passages (Kasper *et al.*, 1983). In this way, it is likely that the difference in pathogenicity between strains in *M. hyopneumoniae* does not solely depend on their metabolism, but also on their ability to adhere to the host.

A recent metagenomic analysis of community composition (Siqueira *et al.*, 2017) has described that *M. hyopneumoniae* is by far the most prevalent species in both healthy and diseased hosts. The difficult isolation of *Mycoplasma* species from diseased lung extracts is due to the fact that, in culture, fast-growing bacteria will overcome the slow-growth of mycoplasmas (McKean *et al.*, 1979). This means that, *in vitro*, the competition for an energy source between fast and slow-growing bacteria usually ends with an overpopulation of the fast growing ones. Given the fact that mycoplasmas survive for longer periods inside the host even in competition with other bacteria (Fano *et al.*, 2005; Overesch and Kuhner, 2017), we must assume that other factors exist and are usually not mimicked in cell culture.

While *M. hyopneumoniae* might cause no harm, depending mostly on the environment, the characteristics of the host and the composition of this dynamic lung microbiome, any unbalance in this system is probably capable of turning a nonpathogenic community into a pathogenic one. The final conclusion is that the disease is a multifactorial process depending on several elements that include intraspecies mechanisms, community composition, host susceptibility and environmental factors. One possibility is that the competition with fast-growing species could result in a lower carbohydrate concentration and that *M. hyopneumoniae* might have to overcome this environmental starvation with the uptake of glycerol or myo-inositol. Since the uptake of myo-inositol does not lead to the production of any toxic metabolite, it is more interesting for its persistence in the long run. Other bacteria will strongly compete for glucose and other related carbohydrates, while *M. hyopneumoniae* will have the entire supply of myo-inositol for itself. The uptake of glycerol as an energy source, on the other hand, will probably lead to the production of toxic hydrogen peroxide as reported in other *Mycoplasma* species. This toxic product combined with other

toxins from the external bacteria in the system would most probably recruit immune system effectors. Since *M. hyopneumoniae* has efficient mechanisms of host evasion (Fano *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2017), the newly introduced and fast-growing bacteria might be eliminated faster and *M. hyopneumoniae*, in this way, would be able to persist longer than other species inside the host (as it is reported *in vivo*).

As mentioned before, virulence factors in *Mycoplasma* species cover a broader concept if compared to other species: they are genes not essential for *in vitro* conventional growth that are instead essential for optimal survival *in vivo*. From our *M. hyopneumoniae* metabolic models, neither the GlpO activity nor the uptake and metabolism of myo-inositol seem to be essential features for *in vitro* growth. However, we were able to show that they might be two metabolic traits important for the enhanced virulence of *M. hyopneumoniae* when compared to *M. hyorhinis* and *M. flocculare* and could be essential for its survival *in vivo* and directly affect its pathogenicity.

Experimental procedures

Mycoplasma cultivation

We used the following strains for experimental validation: *M. hyopneumoniae* strains 7448, 7422 (field isolates) and J (ATCC 25934), *M. hyorhinis* ATCC 17981 and *M. flocculare* ATCC 27716. Cells were cultivated in Friis medium (Friis, 1975) at 37°C for varying periods of time with gentle agitation in a roller drum.

Hydrogen peroxide detection

Hydrogen peroxide was detected in culture medium by the Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen Cat. No A22188), according to the manufacturer's manual. *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* were cultivated for 48 h in modified Friis medium (with no Phenol Red) and thereafter centrifuged. The supernatant was used for the hydrogen peroxide readings compared to a standard curve (Supporting Information Fig. S7). The medium without bacterial growth was used as negative control. We used biological and technical triplicates to infer the average amount of hydrogen peroxide produced, and the concentration was standardized based on the average number of cells from each culture. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test considering *M. flocculare* as a control ($p < 0.05$).

In order to determine if the hydrogen peroxide production was dependent on the glycerol metabolism, we used the Merckoquant Peroxide Test (Merck Cat. No 110011) with detection range of 0.5 to 25 µg of peroxide per ml of solution (as described in Hames *et al.* (2009)). Fifteen ml of *M. hyopneumoniae* 7448 and 7422 strains were grown for

48 h in Friis medium, harvested by centrifugation at 3360 g and washed twice in the incubation buffer (67.7 mM HEPES pH 7.3, 140 mM NaCl, 7 mM MgCl₂). Cells were resuspended in 4 ml of incubation buffer and aliquots of 1 ml were incubated for 1 h at 37°C. To induce hydrogen peroxide production, either glycerol or glucose (final concentration 100 μM or 1 mM) was added to the cell suspension and samples were incubated at 37°C for additional 2 h. Hydrogen peroxide levels were measured using colorimetric strips according to the manufacturer's instructions. Aliquots without any added carbon source served as an incubation control. The statistical significance of the results was calculated using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). The results represent four biological replicates with at least two technical replicates each.

Mycoplasma cell count with flow cytometry

Mycoplasma cells cultivated for hydrogen peroxide detection were sedimented at 3360 g for 20 min at 4°C and washed three times with NaCl 0.9% (1x 3360 g for 20 min and 2x 3360 g for 4 min). Cells were resuspended in 1 ml of NaCl 0.9% and diluted 1:30 for flow cytometry readings in a Guava EasyCyte cytometer (Millipore, USA). Cells were characterized by side-angle scatter (SSC) and forward-angle scatter (FSC) in a four-decade logarithmic scale. Absolute cell counting was performed up to 5000 events and the samples were diluted until the cell concentration was below 500 cells/μl. The number of counts obtained was then converted to cells/ml.

Transcript levels of *glpO* with the use of real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from 20 ml culture of *M. hyopneumoniae* strains 7448, 7422 and J grown at 37°C for 24 h. Cells were harvested by centrifugation at 3360 g for 15 min, resuspended in 1 ml of TRIzol (Invitrogen, USA) and processed according to the manufacturer's instructions followed by DNA digestion with 50 U of DNaseI (Fermentas, USA). Absence of DNA in the RNA preparations was monitored by PCR assays. The extracted RNA was analysed by gel electrophoresis and quantified with the Qubit™ system (Invitrogen, USA). A first-strand cDNA synthesis reaction was conducted by adding 500 ng of total RNA to 500 ng of pd(N)6 random hexamer (Promega, USA) and 10 mM deoxynucleotide triphosphates. The mixture was heated for 65°C for 5 min and then incubated on ice for 5 min. First-strand buffer (Invitrogen, USA), 0.1 M dithiothreitol and 200 U M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase – Invitrogen, USA) were then added to a total volume of 20 μl. The reaction was incubated at 25°C for 10 min and at 37°C for 50 min followed by 15 min at 70°C for enzyme inactivation. A negative control was prepared in parallel, differing only by the absence of the RT enzyme. Quantitative PCR (qPCR) assay was performed using 1:2.5 cDNA as template and Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, USA) with specific primers for *glpO* (5'GGTCCGGGAACCTGCTAAAGC3' and 5'CCAGACGGAAACATCTTAGTTGG3') on StepOne Real-

Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA). The qPCR reactions were carried out at 90°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. A melting curve analysis was done to verify the specificity of the synthesized products and the absence of primer dimers. The amplification efficiency was calculated with the LinRegPCR software application (Ruijter *et al.*, 2009). A relative quantification normalized against unit mass (500 ng of total RNA) was used to analyse the expression data with the equation: $\text{Ratio}(\text{test/calibrator}) = 2^{\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{\text{test}} - CT_{\text{calibrator}}$ (Calviño *et al.*, 2008) and MHP_7448 (Replicate 2) was chosen as calibrator. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$).

Comparative modelling and protein–ligand interaction analysis of Fba and lolJ

The SWISS-MODEL server (Schwede *et al.*, 2003; Biasini *et al.*, 2014) was used for template search and the comparative modelling for all Fba and lolJ proteins in this study. The best homology models were selected according to coverage, sequence identity, Global Model Quality Estimation (GMQE) and QMEAN statistical parameters (Benkert *et al.*, 2009; Benkert *et al.*, 2011). The Fba from *M. hyopneumoniae* along with lolJ and Fba from *B. subtilis* were modeled using the crystal structure of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Bacillus anthracis* in complex with 1,3-dihydroxyacetonephosphate (PDB 3Q94) while Fba-1 from *M. hyopneumoniae* was modeled using the fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Helicobacter pylori* in complex with phosphoglycolohydroxamic acid (PDB 3C52). Both selected templates have the same resolution range (2.30 Å). Fba structures experimentally solved from *E. coli* (Hall *et al.*, 1999) and *G. intestinalis* (Galkin *et al.*, 2009) were used to include information about substrate binding in the active site. The DKGP and FBP ligands were drawn in the Avogadro version 1.1.1 (Hanwell *et al.*, 2012) by editing the tagatose-1,6-biphosphate (TBP) molecule complexed with the Fba structure of *G. intestinalis* (PDB 3GAY). Each model was submitted to 500 steps of an energy minimization protocol using the universal force field (UFF). The DKGP and FBP molecules were inserted into the substrate binding sites of the acquisition models obtained by superposition of the models with the Fba structure of *G. intestinalis*.

Detection of marked myo-inositol through mass spectrometry

Solvents and reagents. Acetonitrile and formic acid (Optima LC/MS Grade) were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). MilliQ water was obtained from a Direct-Q 5UV system (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Deuterated myo-inositol-1,2,3,4,5,6-*d*6 was purchased from CIL (C/D/N Isotopes Inc. Cat No. D-3019, Canada).

Cultivation in the presence of marked myo-inositol. Cells were cultivated in Friis medium supplemented with 0.25 g/l

of deuterated myo-inositol-1,2,3,4,5,6-*d*6 (C/D/N Isotopes Inc. Cat No. D-3019). Cultures were interrupted after 8 h, 24 h and 48 h of cultivation for mass spectrometry analysis.

Sample preparation. All samples were filtered and concentrated with the use of Amicon Ultra 3 kDa (Merck Millipore Cat. No. UFC200324). After this step, samples were dried in a miVac sample concentrator (Genevac, Ipswich, UK) for approximately 45 min at 50°C. All samples were resuspended in ultrapure water to a final concentration of 10 g/l and were subsequently submitted to mass spectrometry.

Mass spectrometry. Aqueous extracts of *Mycoplasma* sp. and commercial deuterated myo-inositol-1,2,3,4,5,6-*d*6 were analysed using an Accurate-Mass Q-TOF LCMS 6530 with LC 1290 Infinity system and Poroshell 120 Hilic column (3 × 100 mm, 2.7 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The extracts were dissolved in water (10 g/l) and injection volume was 3 µl. A binary mobile phase system (A: 0.4% formic acid in milliQ-water and B: acetonitrile) was pumped at a flow rate of 0.9 ml/min at the following gradient: 0–3.5 min, 90% B; 3.5–7 min, 90% to 0% B; 7–9.5 min, 0% B; 9.5–10 min 0% to 90% B; 10–15 min, 90% B (total run: 15 min). MS and MS/MS spectra were obtained in negative mode, with the following conditions: nebulization gas (nitrogen) at 310°C, at a flow of 10 l/min and 40 psg pressure. The capillary tension was 3600 V and gave ionisation energy of 100 eV. In targeted MS/MS mode, collision energy was set at 18 eV. Acquisition range was *m/z* 50–500. MassHunter Qualitative Analysis Software (version B.07.00) was used for data analysis.

Data analysis. Deuterated myo-inositol-1,2,3,4,5,6-*d*6 was quantified in all aqueous extracts by HPLC-MS. For that, a calibration curve (based on peak area) of a commercial myo-inositol was performed from 0.001 g/l to 0.05 g/l in replicate (4 times during the batch analysis). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used to test for differences in residual marked myo-inositol in culture after bacterial growth of all tested strains for 48 h ($p < 0.05$). A two-tailed unpaired t-test was used to compare the residual marked myo-inositol between *M. hyopneumoniae* 7448 and the control medium with two extra timepoints: 8 h and 24 h ($p < 0.05$).

Determination of cell viability of *M. hyopneumoniae* in myo-inositol defined medium

All available strains were grown in Friis medium at 37°C for 48 h, sedimented by centrifugation at 3360 *g* for 20 min at 4°C, washed twice with ice cold PBS and inoculated in glucose regular defined medium (described in Ferrarini *et al.* (2016), supplemented with 5 g/l of succinate) or myo-inositol defined medium (regular defined medium depleted with glucose and glycerol and supplemented with 0.5 g/l of myo-inositol and 5 g/l of succinate). Viability of cells was measured by ATP production with live cells recovered after 8 h of growth in either media with a BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay Kit (Promega, USA) according to

the manufacturer's manual. Luminescence was recorded in a SpectraMax MiniMax 300 Imaging Cytometer (Molecular Devices, USA) with an integration time of 0.5 s in an opaque-walled multiwell plate. Average ATP production was calculated with biological duplicates and technical triplicates. The ATP production of each strain was compared between regular defined medium and myo-inositol defined medium to determine the ratio of viable cells and to allow a comparison between strains. A 10-fold serial dilution of ATP was used as a standard curve (Supporting Information Fig. S8). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$).

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES-COFECUB 782/13 and Inria. MGF was granted postdoctoral fellowship funded by the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013)/ERC grant agreement no. [247073]10. SGM was the recipient of a CAPES doctoral fellowship. DP was granted postdoctoral fellowship funded by the European Union Framework Program 7, Project BacHbERRY number FP7–613793. JFRB is a recipient of a CAPES postdoctoral fellowship. The mass spectrometry analysis was carried out in the Centre d'Etude des Substances Naturelles at the University of Lyon.

Authors' contributions

MGF, SGM, MFS and AZ conceived and designed the work. MGF and SGM performed most of the experimental work. DP, GM and GC collaborated in the mass spectrometry experiments and analysis. JFB performed tridimensional analysis of proteins. All authors collaborated in the analysis of all data. MGF and SGM wrote the manuscript with inputs from the other authors. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T. (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**: 343–350.
- Benkert, P., Kunzli, M., and Schwede, T. (2009) QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res* **37**: W510–W514.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**: 235–242.

- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., *et al.* (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**: W252–W258.
- Bischof, D.F., Janis, C., Vilei, E.M., Bertoni, G., and Frey, J. (2008) Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun* **76**: 263–269.
- Brown, D.R., Demcovitz, D.L., Plourde, D.R., Potter, S.M., Hunt, M.E., Jones, R.D., and Rotstein, D.S. (2006) *Mycoplasma iguanae* sp. nov., from a green iguana (*Iguana iguana*) with vertebral disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 761–764.
- Browning, G.F., Noormohammadi, A.H., and Markham, P.F. (2014) Identification and characterization of virulence genes in mycoplasmas. In *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. Browning, G.F., and Citti, C. (eds). UK: Caister Academic Press, pp. 77–90.
- Burnett, T.A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Uphoff, C., Srivastava, M., *et al.* (2006) P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol* **60**: 669–686.
- Calviño, M., Bruggmann, R., and Messing, J. (2008) Screen of genes linked to high-sugar content in stems by comparative genomics. *Rice* **1**: 166–176.
- Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., *et al.* (2001) The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res* **29**: 2145–2153.
- Citti, C., Kim, M.F., and Wise, K.S. (1997) Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun* **65**: 1773–1785.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**: 147–150.
- Corbett, D., and Roberts, I.S. (2009) The role of microbial polysaccharides in host-pathogen interaction. *F1000 Biol Rep* **1**: 30.
- Davenport, P.G., Shortridge, E.H., and Voyle, B. (1970) Polyserositis in pigs caused by infection with *Mycoplasma*. *N Z Vet J* **18**: 165–167.
- Dickson, R.P., and Huffnagle, G.B. (2015) The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathog* **11**: e1004923.
- Djordjevic, S.P., Cordwell, S.J., Djordjevic, M.A., Wilton, J., and Minion, F.C. (2004) Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun* **72**: 2791–2802.
- Downes, C.P., and Macphee, C.H. (1990) Myo-inositol metabolites as cellular signals. *Eur J Biochem* **193**: 1–18.
- Fano, E., Pijoan, C., and Dee, S. (2005) Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J Vet Res* **69**: 223–228.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., and Torremorell, M. (2006) Assessment of the effect of sow parity on the prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets at weaning. In *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society*, Copenhagen 1: 96.
- Ferrarini, M.G., Siqueira, F.M., Mucha, S.G., Palama, T.L., Jobard, E., Elena-Herrmann, B., *et al.* (2016) Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics* **17**: 353.
- Friis, N.F. (1975) Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* **27**: 337–339.
- Galkin, A., Li, Z., Li, L., Kulakova, L., Pal, L.R., Dunaway-Mariano, D., and Herzberg, O. (2009) Structural insights into the substrate binding and stereoselectivity of *Giardia* fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Biochemistry* **48**: 3186–3196.
- Gillaspy, G.E. (2011) The cellular language of myo-inositol signaling. *New Phytol* **192**: 823–839.
- Gonzalez-Salgado, A., Steinmann, M.E., Greganova, E., Rauch, M., Maser, P., Sigel, E., and Butikofer, P. (2012) Myo-Inositol uptake is essential for bulk inositol phospholipid but not glycosylphosphatidylinositol synthesis in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **287**: 13313–13323.
- Guo, Y., Zhu, H., Wang, J., Huang, J., Khan, F.A., Zhang, J., *et al.* (2017) TrmFO, a Fibronectin-Binding Adhesin of *Mycoplasma bovis*. *Int J Mol Sci* **18**: 1732.
- Hall, D.R., Leonard, G.A., Reed, C.D., Watt, C.I., Berry, A., and Hunter, W.N. (1999) The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolhydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J Mol Biol* **287**: 383–394.
- Hames, C., Halbedel, S., Hoppert, M., Frey, J., and Stulke, J. (2009) Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **191**: 747–753.
- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., and Hutchison, G.R. (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **4**: 17.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkil, E., Li, B.C., and Herrmann, R. (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 4420–4449.
- Hofmann, K., and Stoffel, W. (1993) TMbase—a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**: 166.
- Kahsay, R.Y., Gao, G., and Liao, L. (2005) An improved hidden Markov model for transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics* **21**: 1853–1858.
- Kannan, T.R., and Baseman, J.B. (2000) Hemolytic and hemoxidative activities in *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* **68**: 6419–6422.
- Kasper, D.L., Weintraub, A., Lindberg, A.A., and Lonngren, J. (1983) Capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from two *Bacteroides fragilis* reference strains: chemical and immunochemical characterization. *J Bacteriol* **153**: 991–997.
- Katz, R., Siman-Tov, R., and Naot, Y. (1983) Comparison of mitogens from *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma neurolyticum*. *Yale J Biol Med* **56**: 613–621.
- Kobisch, M., and Friis, N.F. (1996) Swine mycoplasmoses. *Rev Off Int Epizoot* **15**: 1569–1605.
- Kohler, P.R., Zheng, J.Y., Schoffers, E., and Rossbach, S. (2010) Inositol catabolism, a key pathway in *Sinorhizobium meliloti* for competitive host nodulation. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7972–7980.

- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567–580.
- Lartigue, C., Lebaudy, A., Blanchard, A., El Yacoubi, B., Rose, S., Grosjean, H., and Douthwaite, S. (2014) The flavoprotein Mcap0476 (RlmFO) catalyzes m5U1939 modification in *Mycoplasma capricolum* 23S rRNA. *Nucleic Acids Res* **42**: 8073–8082.
- Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M., and Gautier-Bouchardon, A.V. (2006) Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1959–1966.
- Li, Y.Z., Ho, Y.P., Chen, S.T., Chiou, T.W., Li, Z.S., and Shiuan, D. (2009) Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Mosc)* **74**: 215–220.
- Liu, W., Xiao, S., Li, M., Guo, S., Li, S., Luo, R., et al. (2013) Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics* **14**: 80.
- Lo, W.S., Ku, C., Chen, L.L., Chang, T.H., and Kuo, C.H. (2013) Comparison of metabolic capacities and inference of gene content evolution in mosquito-associated *Spiroplasma diminutum* and *S. taiwanense*. *Genome Biol Evol* **5**: 1512–1523.
- Machado, L.D.P.N., Paes, J.A., Leal, F.M.A., Moura, H., Barr, J.R., and Ferreira, H.B. (2018) Comparative surface proteomic approach reveals qualitative and quantitative differences of two *Mycoplasma hyopneumoniae* strains and *Mycoplasma flocculare*. *In preparation*, 2018.
- Madsen, M., Nettleton, L.D., Thacker, E.L., and Minion, F.C. (2006) Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology (Reading, Engl.)* **152**: 937–944.
- Madsen, M.L., Nettleton, D., Thacker, E.L., Edwards, R., and Minion, F.C. (2006) Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect Immun* **74**: 160–166.
- Maes, D., Sibila, M., Kuhnert, P., Segales, J., Haesebrouck, F., and Pieters, M. (2017) Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.12677>
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., and de Kruif, A. (1996) Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q* **18**: 104–109.
- Mare, C.J., and Switzer, W.P. (1965) New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin* **60**: 841–846.
- McKean, J.D., Andrews, J.J., and Farrington, D.O. (1979) Evaluation of diagnostic procedures for detection of mycoplasmal pneumonia of swine. *J Am Vet Med Assoc* **174**: 177–180.
- Meyling, A., and Friis, N.F. (1972) Serological identification of a new porcine *Mycoplasma* species, *Mycoplasma flocculare*. *Acta Vet Scand* **13**: 287–289.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., and Mahairas, G.G. (2004) The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* **186**: 7123–7133.
- Oneal, M.J., Schafer, E.R., Madsen, M.L., and Minion, F.C. (2008) Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**: 2581–2588.
- Overesch, G., and Kuhnert, P. (2017) Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* sequence types in spite of a control program for enzootic pneumonia in pigs. *Prev Vet Med* **145**: 67–72.
- Overmars, L., Kerkhoven, R., Siezen, R.J., and Francke, C. (2013) MGcV: the microbial genomic context viewer for comparative genome analysis. *BMC Genomics* **14**: 209.
- Pendarvis, K., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Petersen, A.C., Djordjevic, S.P., Burgess, S.C., and Minion, F.C. (2014) Proteogenomic mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* virulent strain 232. *BMC Genomics* **15**: 576.
- Pieters, M., Fano, E., Pijoan, C., and Dee, S. (2010) An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *Can J Vet Res* **74**: 157–160.
- Pilo, P., Frey, J., and Vilei, E.M. (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J* **174**: 513–521.
- Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D., and Frey, J. (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* **187**: 6824–6831.
- Pinto, P.M., Chemale, G., de Castro, L.A., Costa, A.P., Kich, J.D., Vainstein, M.H., et al. (2007) Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol* **121**: 83–93.
- Pinto, P.M., Klein, C.S., Zaha, A., and Ferreira, H.B. (2009) Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci* **7**: 45.
- Razin, S., and Jacobs, E. (1992) *Mycoplasma* adhesion. *J Gen Microbiol* **138**: 407–422.
- Reolon, L.A., Martello, C.L., Schrank, I.S., and Ferreira, H.B. (2014) Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach. *PLoS One* **9**: e112596.
- Reynolds, T.B. (2009) Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *Microbiology* **155**: 1386–1396.
- Rose, D.L., Tully, J.G., and Wittler, R.G. (1979) Taxonomy of some swine *Mycoplasmas*: *Mycoplasma suis pneumoniae* goodwin et al. 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* mare and switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* meyling and friis 1972. *Int J Syst Evol Microbiol* **29**: 83–91.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias

- in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**: e45.
- Ruiz, A., Galina, L., and Pijoan, C. (2002) *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. *Can J Vet Res* **66**: 79–85.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381–3385.
- Seymour, L.M., Deutscher, A.T., Jenkins, C., Kuit, T.A., Falconer, L., Minion, F.C., et al. (2010) A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J Biol Chem* **285**: 33971–33978.
- Seymour, L.M., Jenkins, C., Deutscher, A.T., Raymond, B.B., Padula, M.P., Tacchi, J.L., et al. (2012) Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol* **14**: 81–94.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., and Segales, J. (2009) Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J* **181**: 221–231.
- Sibylle, B., Joachim, F., and Paola, P. (2015) Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* **179**: 15–22.
- Simmons, W.L., and Dybvig, K. (2007) How Some Mycoplasmas evade host immune responses. *Microbe Mag* **2**: 537–543.
- Siqueira, F.M., Gerber, A.L., Guedes, R.L.M., Almeida, L.G., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T.R., and Zaha, A. (2014) Unravelling the transcriptome profile of the swine respiratory tract mycoplasmas. *PLoS One* **9**: e116122.
- Siqueira, F.M., Perez-Wohlfeil, E., Carvalho, F.M., Trelles, O., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T.R., and Zaha, A. (2017) Microbiome overview in swine lungs. *PLoS One* **12**: e0181503.
- Siqueira, F.M., Thompson, C.E., Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Reolon, L., Almeida, L.G., et al. (2013) New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics* **14**: 175.
- Stemke, G.W., Laigret, F., Grau, O., and Bove, J.M. (1992) Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 220–225.
- Szczepanek, S.M., Boccaccio, M., Pflaum, K., Liao, X., and Geary, S.J. (2014) Hydrogen peroxide production from glycerol metabolism is dispensable for virulence of *Mycoplasma gallisepticum* in the tracheas of chickens. *Infect Immun* **82**: 4915–4920.
- Tacchi, J.L., Raymond, B.B., Haynes, P.A., Berry, I.J., Widjaja, M., Bogema, D.R., et al. (2016) Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol* **6**: 150210–150150.
- Tajima, M., and Yagihashi, T. (1982) Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun* **37**: 1162–1169.
- Thacker, E.L., and Minion, F.C. (2012) Mycoplasmosis. In *Diseases of Swine*. Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., and Stevenson, G.W. (eds). USA: John Wiley and Sons, Inc, pp. 779–797.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., and Janke, B.H. (2001) Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol* **39**: 2525–2530.
- Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., et al. (2005) Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* **187**: 5568–5577.
- Vilei, E.M., and Frey, J. (2001) Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O(2) production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 85–92.
- Waites, K.B., and Talkington, D.F. (2004) *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* **17**: 697–728.
- Whittlestone, P. (2012) Porcine mycoplasmas. In *The Mycoplasmas V2: Human and Animal Mycoplasmas*. Tully, J. and Whitcomb, R.F. (eds). New York: Academic Press, Inc, pp. 133–176.
- Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H., and Fujita, Y. (2008) myo-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **283**: 10415–10424.
- Young, T.F., Thacker, E.L., Erickson, B.Z., and Ross, R.F. (2000) A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol* **71**: 269–279.
- Zielinski, G.C., and Ross, R.F. (1990) Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. *Am J Vet Res* **51**: 344–348.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

4.2 – Capítulo 2:

***Mycoplasma hyopneumoniae* elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells.**

Scheila G. Mucha^{1*}, Mariana G. Ferrarini^{1*}, Carol C. Moraga^{2,3}, Alex Di Genova Bravo^{2,4}, Laurent Guyon⁵, Florence Tardy^{6,7}, Sophie Rome^{8,9}, Marie-France Sagot^{2,3§} & Arnaldo Zaha^{1,§}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² ERABLE, Inria, Lyon, France.

³ LBBE, UCBL, Lyon, France.

⁴ CMM-University of Chile, Santiago, Chile.

⁵ CEA-Grenoble Bioscience and Biotechnology Institute of Grenoble, France.

⁶ ANSES, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses de Ruminants, Lyon, France.

⁷ Université de Lyon, VetAgro Sup, Lyon, France.

⁸ CARMEN, Université de Lyon, Lyon, France

⁹ Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins, France

* These authors contributed equally to this work.

§Correspondence authors: zaha@cbiot.ufrgs.br; marie-france.sagot@inria.fr

Manuscrito em preparação, a ser submetido à revista *Scientific Reports*.

O material suplementar referente aos resultados desse manuscrito está contido nos Anexos dessa tese (Anexo 9.1).

As tabelas suplementares podem ser encontradas em:

<https://tinyurl.com/supptablmucha2018>

***Mycoplasma hyopneumoniae* elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells**

Scheila G. Mucha^{1,+}, Mariana G. Ferrarini^{1,+}, Carol C. Moraga^{2,3}, Alex Di Genova Bravo^{2,4}, Laurent Guyon⁵, Florence Tardy^{6,7}, Sophie Rome^{8,9}, Marie-France Sagot^{2,3,*}, and Arnaldo Zaha^{1,*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²ERABLE, Inria, Lyon, France

³LBBE, UCBL, Lyon, France

⁴CMM-University of Chile, Santiago, Chile

⁵CEA-Grenoble Bioscience and Biotechnology Institute of Grenoble, France

⁶Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France

⁷Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France

⁸CARMEN, Université de Lyon, Lyon, France

⁹Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins, France

*Correspondence and request for materials should be addressed to AZ (zaha@cbiot.ufrgs.br) or MFS (marie-france.sagot@inria.fr)

+These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is an economically devastating pathogen in pig farming industry, however little is known about its relation with the swine host. To improve our understanding on this interaction, we infected epithelial cells with *M. hyopneumoniae* to identify the effects of the infection on the expression of swine genes and miRNAs. In addition, we identified miRNAs differentially expressed (DE) in the extracellular milieu and in exosomes released by infected cells. A total of 1,283 genes and 170 miRNAs were DE post-infection. We identified the up-regulation of several genes related to redox homeostasis and antioxidant defense, most of them putatively regulated by the transcription factor NRF2. Down-regulated genes were enriched in cytoskeleton and ciliary function, which could partially explain *M. hyopneumoniae* induced ciliostasis. Our predictions showed that DE miRNAs could be regulating the aforementioned specific functions, since we detected down-regulation of miRNAs predicted to target antioxidant genes and up-regulation of miRNAs targeting ciliary and cytoskeleton genes. Interestingly, most down-regulated miRNAs were found in exosomes. Based on these observations, *M. hyopneumoniae* seems to elicit an antioxidant response induced by NRF2 in infected cells; in addition, we propose that ciliostasis caused by this pathogen might be related to down-regulation of ciliary genes.

Introduction

Respiratory diseases are among the major health problems in the pig farming industry. *Mycoplasma hyopneumoniae* is the causative agent of swine enzootic pneumonia, a chronic respiratory disease that affects herds worldwide. Although *M. hyopneumoniae* does not cause high mortality, it is considered the most costly pathogen for swine production (Maes *et al.*, 1996). This is mainly due to costs of treatment and vaccination and losses related to decreased animal performance. In addition, *M. hyopneumoniae* is essential for the establishment of secondary pathogens in the host, which leads to an increase in mortality and in production costs (Maes *et al.*, 2017). *M. hyopneumoniae* attaches to the cilia of the tracheal epithelial cells with participation of adhesins (Djordjevic *et al.*, 2004), resulting in ciliostasis and cell death (Debey and Ross, 1994), which predisposes the host to infections by secondary pathogens (Ciprian *et al.*, 1988; Maes *et al.*, 1996). Nevertheless, besides adhesins, virulence factors are not well known in this bacterium. However, a recent study from our group indicated hydrogen peroxide production from glycerol and myo-inositol metabolism as important traits that might be related with pathogenesis and with the predominance of *M. hyopneumoniae* in the swine respiratory tract (Ferrarini *et al.*, 2018).

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs (ncRNAs) of 18-24 nt in part responsible for post-transcriptional gene regulation in eukaryotes. These evolutionarily conserved molecules influence fundamental biological

processes, including cell proliferation, differentiation, apoptosis, immune response, and metabolism (Bartel, 2004; Luo *et al.*, 2017). The binding of miRNAs to target mRNAs changes the mRNA stability and translation efficiency (Lawless *et al.*, 2013), leading to degradation, suppression or even up-regulation of the target mRNA levels (Bartel, 2004; Duval *et al.*, 2016). miRNA-mRNA interactions are complex; one single miRNA can target a large number of genes belonging to diverse functional groups. Alternatively, the 3'-UTR of a single mRNA can be targeted by multiple miRNAs (Lim *et al.*, 2005; Kim and Nan, 2006). Thus, by modulating miRNA abundance, it is possible to fine-tune the expression of proteins within the cell in a very precise manner (Bartel, 2004; Kim and Nan, 2006).

Recently, it has been widely reported that miRNAs can be packed into exosomes and be transferred to neighboring or distant cells to regulate cell function (Valadi *et al.*, 2007; Rome, 2013; Chen *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2017). Exosomes are small membrane vesicles (50-150 nm) released from eukaryotic cells both constitutively and upon induction, under normal and pathological conditions (Rome, 2013; Schorey *et al.*, 2015). These vesicles are involved in several cellular functions and have the potential to selectively interact with specific target cells (Forterre *et al.*, 2014; Rana *et al.*, 2012). In addition to miRNAs, exosomes can transmit information among cells by transferring proteins, lipids and nucleic acids that seem to be selected non-randomly, with some specific populations of molecules being preferentially packaged into the vesicles (Rome, 2013; Schorey *et al.*, 2015). As an efficient cellular signaling and communication system, the release of exosomes by infected host cells has been recognized as a common phenomenon, in some cases beneficial to the host and in others beneficial to the pathogen (Silverman and Reiner, 2011).

Host-pathogen interactions result in signaling and physiological modifications in host cells that induce differential miRNA expression and miRNA-mediated post-transcriptional regulation of genes involved in immune response and several other cell pathways (Bao *et al.*, 2015; Muxel *et al.*, 2017). Therefore, simultaneous identification of miRNA and mRNA differential expression provides a comprehensive view on host-pathogen interactions during the infection and the disease establishment process. In recent years, efforts have been made to identify miRNAs regulated by infection in the host (Lawless *et al.*, 2013; Staedel and Darfeuille, 2013; Maudet *et al.*, 2014; Bao *et al.*, 2015). However, the identification of miRNAs during infection of swine cells with *M. hyopneumoniae* has not been investigated up to date. In this way, this study aimed to analyze the differential expression of mRNAs and miRNAs of an epithelial porcine cell line infected with *M. hyopneumoniae*. In addition to the intracellular differential expression, we also analyzed the difference in the expression of miRNAs in the extracellular milieu and in exosomes, as they play an important role in cellular communication and in the dissemination of host and pathogen derived molecules during infection. Hence, we were able to identify a correlation between genes and targets of miRNAs differentially expressed (DE), with a general up-regulation of genes involved in antioxidant response and a down-regulation of genes related to cytoskeleton and ciliary beating.

Results

Infection of NPTr cells with *M. hyopneumoniae*

To analyze the differential expression of New-born pig trachea (NPTr) cells during the infection with *M. hyopneumoniae*, we first observed the infection by immunofluorescence microscopy. These analyses were performed to detect the adherence of *M. hyopneumoniae* to NPTr cells. Figure 1 shows the co-localization of *M. hyopneumoniae* with the membrane of NPTr cells, corroborating the success of the infection. In addition, it is possible to see that in the areas where there is higher concentration of mycoplasmal cells, the NPTr cell membrane is more damaged. During the course of the infection, we could observe (data not shown) increased cell death and altered cell morphology in comparison to the control condition.

RNA sequencing, processing and annotation

A total of 6 mRNA and 14 small RNA (sRNA) libraries were generated with the Illumina HiSeq2500 platform. The complete description of samples is provided in Table 1 and Figure 2. The raw reads were submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus under accession number XXXXXX. After removing adaptors and filtering low quality reads, mRNA-seq yielded from 40 to 43 M paired-end clean reads for all 6 samples (approx. 97% of raw reads) and sRNA-seq yielded from 1 to 21 M single-end clean reads. Trimming and mapping information for each mRNA and sRNA sample is available in Supplementary Tables S1 and S2.

Around 85% of the clean reads were mapped against the porcine genome (Sscrofa10.2 - Ensembl release 89) and 40% against annotated genes. For intracellular sRNAs (INTRA: samples s-9 to s-14), we were able to map around 93% against the porcine genome. We also mapped all sRNA reads against the *M. hyopneumoniae* strain 7448 genome (Supplementary Table S2) and most samples had no more than 0.5% of unique mycoplasmal reads. The exception to this rule were the extracellular sRNA samples infected with the bacterium (s-S7 and s-S8), which had up to 20% of reads mapped to *M. hyopneumoniae*, as they were expected to have more remnants of mycoplasmal cells. We also used these bacterial mapped reads to search for possible bacterial ncRNAs described by Siqueira and collaborators (2016).

Intracellular sRNA samples had similar sequencing depth and showed a typical miRNA distribution length curve ranging from 18 to 26 nt, with a peak at 22 nt (Supplementary Figure S1). Extracellular exosomal sRNA samples (EXO: s-S1 and s-S2) had some RNA degradation (< 18 nt), but maintained a pronounced peak at 22 nt. Extracellular sRNA from vesicle-free supernatant (SN: samples s-S3 and s-S4) were more problematic, probably due to (i) too many pre-processing steps and (ii) the presence of RNAses in the extracellular environment. Sample s-S4 did not yield a minimum amount of reads necessary for subsequent steps and this condition (SN) was not used for further analyses. Total extracellular sRNA samples (EXTRA: s-s5 to s-S8) had more RNA degradation (as expected, because of the presence of RNAses and degraded mRNAs in the extracellular environment); however, we were able - to a certain extent - to filter out (i) sequences < 18 nt and (ii) sequences mapped to the *M. hyopneumoniae* genome (especially for s-S7 and s-S8). Sample s-s6 (EXTRA) had a sequencing depth smaller than its replicate (s-S5); however, the distribution of counts was overall similar between replicates and we could use it for further analyses. We also performed a homology analysis of raw reads and we provide the percentage of intracellular clean reads clustered by classical types of sRNAs (Supplementary Figure S1), showing an enrichment of miRNA-homolog reads (around 40%).

We created a *Sus scrofa* putative miRNA database (ssc miRNA DB) with a total of 1,906 miRNAs from three different sources: 411 miRNAs annotated in miRBase (*Sus scrofa* release 21), 722 annotated by Martini and collaborators (2014) and 773 novel putative miRNAs predicted by our analysis. More than 50% of intracellular sRNA clean reads were aligned against the putative ssc miRNA DB (Supplementary Table S2).

mRNA expression profiles

In the present study, we detected a total of 20,274 (out of 23,215) genes expressed with at least 10 counts across the 6 mRNA libraries from NPTr cells (Supplementary Table S3). We used two different methods for the detection of DE genes: EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) and DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Overall, DESeq2 detected more significant adjusted p-values with less accentuated fold changes (FCs), while EdgeR detected less significant false discovery rates (FDR) with more extreme FCs. Both techniques have been widely used separately in several publications, and in order to select good candidates for testing, we took into account both methods.

Differentially expressed mRNAs in NPTr cells infected with M. hyopneumoniae

In total, we detected 1,283 DE genes (p-value < 0.05), from which 511 were common to both methods, 712 were exclusive to DESeq2 and 88 were exclusive to EdgeR (28 of these were excluded due to the presence of outliers). Information from the top 15 up-regulated and down-regulated DE genes is provided in Table 2. Even though we had interesting and similar results separately from each method, we tried as much as possible to select for experimental validation genes that were detected by both methods. The complete DE gene data are found in Supplementary Table S4.

As expected, we found several up-regulated genes related to immune response and inflammation, such as C3 complement, SAA3, chemokines (CXCL2 and CCL20) and galectins (galectin-2 and galectin-8). Interestingly, we also detected 64 up-regulated genes that were related to redox homeostasis and antioxidant defense. *M. hyopneumoniae* infection induced the expression of genes related to the two biggest redox systems in NPTr cells: glutathione (GGT1, GGT5, GGLC, GSR) and thioredoxin (TXNRD1, PRDX5, PRDX6). There was also up-regulation of genes involved in the regeneration of NADPH (which is used by the aforementioned redox systems) and of several genes coding for enzymes related to detoxification (such as SOD2, HMOX, GST, NQO1 and AKR gene family).

From the list of genes related to redox homeostasis, 46 have already been described as targets of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) in closely related species (Table 3). This transcription factor protects the cell against oxidative damage by recognizing and binding to antioxidant response element (ARE) motifs in the promoter region of target genes, activating their transcription in mice (Nioi *et al.*, 2003). We were able to detect at least one conserved ARE sequence upstream the start codon in all targets (TGAnnnGC) with the aid of fuznuc from EMBOSSv6.6.0 (Rice *et al.*, 2000) (Supplementary Table S5).

Down-regulated genes were enriched in cytoskeleton and ciliary function. Dyneins (DNAH11, DHAH12, DNAI2, DNAL1) which are essential for the ciliary motility, genes necessary for axonemal dynein assembly (DYX1C1), genes related to ciliogenesis (CEP162, DCDC2, MACF1, IFT57), ciliary polarization (INTU), ciliary beating (MYO1D) and several others in which the mutation or knockout is associated with ciliopathies (LRRC6, MNS1, AK7), were down-regulated in the infected condition. Several cytoskeleton genes related to mitotic spindle, chromosome segregation and cell division (GAS2L3, TPX2, MYO10, BUB1B, ASPM, CENP-I) were also down-regulated in our analyses (Supplementary Table S4).

The selected DE mRNAs expressed were validated through reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and results are available in Supplementary Figure S2. Most of the genes experimentally tested were in accordance with the expression data from sequencing (Table 2). Genes for which the results of RT-qPCR were not in accordance with sequencing were not considered for further analysis.

Gene Ontology (GO) enrichment analysis

We performed GO enrichment analyses with the complete up-regulated or down-regulated gene lists from both methods (EdgeR and DESeq2) separately. Since we did not detect the exact same DE genes from both methods, we did not expect the results to be equal. However, both methods yielded very similar results and all enriched GO terms from the EdgeR lists were found within the results from DESeq2 (Supplementary Table S6). We show the complete results of GO enrichment for up-regulated and down-regulated genes in DESeq2 separately in Figure 3 (p-value < 0.05 and absolute fold enrichment \geq 0.4).

In the up-regulated genes, the top enriched terms either in biological process, molecular function or cellular component were related to protein synthesis, oxidation-reduction activity and cell-cell communication related terms (such as exosomes, anchoring and focal adhesion functions). In down-regulated genes, the majority of overrepresented terms in all three categories were related to cell cycle and cytoskeleton. The complete GO enrichment data is found in Supplementary Table S6.

miRNA expression profiles and differential expression

miRNAs in *S. scrofa* genome We predicted 773 novel putative miRNAs in intracellular samples (Supplementary Table S7) and these were added to the ssc miRNA DB and were subsequently tested for differential expression. In all 14 sRNA samples, we detected (with at least 10 counts across all libraries), 288 from the 411 putative miRNAs from miRBase and 229 miRNAs described by Martini and collaborators (2014). From our predictions, 280 putative miRNAs also had more than 10 counts across all libraries. Raw counts are provided in Supplementary Table S8.

In total, we identified 170 DE miRNAs (121 up-regulated, 48 down-regulated and 1 ambiguous). Table 4 shows the 10 selected up-regulated and down-regulated miRNAs detected in this study, and the complete list of DE miRNAs is summarized in Supplementary Table S9. Several homologs of these miRNAs have already been linked to bacterial infection response or immune system response in the literature and these references are also listed in Table 4. With the exception of one ambiguous case (ssc-miR-9842-5p), whenever a miRNA was detected as DE in more than one condition, the change in expression (either up- or down-regulated) was in accordance between them. Interestingly, most of the down-regulated miRNAs of exosomes were DE only in these vesicles, which could be seen as a specific message they are trying to communicate to other cells.

sRNAs in *M. hyopneumoniae* genome Among the species-specific sRNAs of *M. hyopneumoniae* described by Siqueira and collaborators (2016), we were able to detect (with at least 10 counts in extracellular samples S7 and S8) 26 putative sRNAs. Raw counts are provided in Supplementary Table S10. These sRNAs were described by the authors to target one or small sets of genes in the *M. hyopneumoniae* genome. Given that we were not able to perform DE analysis with these data, they will no longer be discussed here.

Target prediction

In order to better understand the biological functions that could be involved with these 170 DE miRNAs, we predicted their potential targets. We used miRanda (Betel *et al.*, 2010), PITA (Kertesz *et al.*, 2007), and TargetScan (Lewis *et al.*, 2003) to predict possible targets in the porcine genome, and RNAHybrid (Kruger *et al.*, 2006) to assess the hybridization energy between a miRNA-mRNA interaction pair. We only took into account genes that were detected as targets by at least two methods with a good score (as described in the Methods section). All DE miRNAs except for one had at least one DE gene as a predicted target.

We detected a total of 59,304 putative interaction pairs between miRNAs and mRNAs. In this way, on average, a miRNA could potentially target 349 genes in the entire porcine genome. However, we only considered as targets DE mRNAs, which significantly decreased our list to a total of 1,682 interaction pairs. Given that in the literature most of the experimental validation is related to an interaction pair with inversed regulation, we also decided to restrict our analysis to this type of interaction (and kept a total of 1,051 interaction pairs). In this context, a permissive interaction is generally described as one that occurs between a down-regulated miRNA and an up-regulated mRNA, while a repressive interaction is one in which the miRNA is up-regulated with consequent down-regulation of the target mRNA (Martini *et al.*, 2014). In our results, permissive interactions represented 135 genes and 49 miRNAs, while repressive interactions occurred between 204 genes and 120 different miRNAs. Supplementary Table S11 summarizes the permissive and repressive target pairs predicted in this study.

GO enrichment analysis

We performed GO enrichment analysis with DE targets from intracellular, extracellular and exosomal DE miRNAs. We were able to identify a correlation between enriched terms in miRNA targets with some of the GO terms detected in the mRNA up-regulated or down-regulated GO results (Figure 4). Target genes from permissive interactions were associated with terms related to cofactor metabolic process and oxidation-reduction activity, whereas target genes from the repressive interactions had enriched terms related to cytoskeleton. It is important to highlight the relevance of miRNAs found in exosomes and in extracellular samples in the identification of GO enriched terms of miRNA targets, since only a small part of the permissive and repressive interactions involved intracellular miRNAs. Complete GO enrichment of miRNA targets is found in Supplementary Table S12.

Network interaction analysis

We created a regulatory network with DE miRNAs and target mRNAs related to redox homeostasis detected in this study (Figure 5). We also included information about interactions from the BioGRID v3.4 database (Stark *et al.*, 2006; Chatr-Aryamontri *et al.*, 2017), a general repository that includes experimentally validated physical (protein-protein) and genetic interactions. The network shows a high level of connectivity and we were able to detect miRNAs that interacted only with NRF2 activated targets (such as ssc-miR-31). We were able to detect miRNAs that seemed to regulate more generally redox homeostasis genes and also miRNAs whose targets came from sets of genes with distinct functions (such as glycolysis, immune system defense, ribosomes, among others), indicating that this response might be related to several other important functions within the cell.

Discussion

M. hyopneumoniae is considered the most costly pathogen for swine production. However, apart from studies related to adherence to the host cells, little is known about the host-pathogen relationship between this bacterium and the swine host. In this way, in order to improve our understanding on this interaction, we infected swine tracheal epithelial cells with *M. hyopneumoniae* to identify the effects of the infection on the expression of swine genes and miRNAs. In addition, we identified miRNAs differentially expressed in the extracellular milieu and in exosomes released by the infected cells. To our knowledge, the simultaneous identification of miRNA-mRNA profiling during this particular infection has never been widely studied and can help us draw a full picture of the changes in gene expression and the possible regulatory mechanisms of host cells during disease establishment.

In general, up-regulated genes were related to antioxidant response, protein synthesis and cell-cell communication while down-regulated genes were related to cytoskeleton and cell cycle. The up-regulation of cell-cell communication becomes very interesting, when we realize that most DE miRNAs were detected only in the extracellular and exosome samples. Moreover, most of the down-regulated miRNAs of exosomes were DE only in these vesicles, indicating that the cells might be selecting specific populations of miRNAs to be packaged into these vesicles. We also performed the prediction of mRNA targets for the DE miRNAs. Since experimental validation of the miRNA targets reported so far is predominantly related to pairs of miRNA-mRNA with inversed regulation (up-regulation of a miRNA results in down-regulation of its target gene and vice-versa) (Bartel and Chen, 2004), for subsequent analyses, we only considered the permissive and repressive interaction pairs. Although there are situations in which both mRNA and miRNA are differentially expressed in the same sense and these represent forms of gene regulation, they will not be further discussed here. In this way, we were able to identify 321 permissive and 721 repressive interactions between DE mRNAs and miRNAs.

Since we used an attenuated strain of *M. hyopneumoniae* to infect the swine cells, we did not expect extreme changes in gene expression. Indeed, most of the fold changes (FCs) of the DE genes analyzed in our results were not very high. The attenuated strain was chosen because previous infection assays of our group showed that highly pathogenic strains, such as 7448 or 7422, have greatly damaged cells (not published) and we were not able to recover RNA with sequencing quality. Nevertheless, even if the strain used (J) is considered non-pathogenic, it generates a considerable immune response. A similar situation occurs in vaccine development, in which attenuated strains are used to generate immune response without causing lethal effects. Thus, we believe that infections with pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* would generate a more pronounced effect on gene expression than what was observed here. However, our results remain important, as they provide a general overview of *M. hyopneumoniae* infection in the host cells.

In the up-regulated genes, besides genes related to immune response and inflammation, which were already expected to be DE, we also detected several genes related with redox homeostasis and antioxidant activity. Looking closer at these genes, we identified that 46 out of 65 seem to be putatively regulated by the transcription factor NRF2 (Table 3). As previously mentioned, NRF2 is a transcription factor that protects the cell against oxidative damage through transcription activation of cytoprotective genes (Cho *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2013). More specifically, several studies have shown this protective role of NRF2 in bacterial lung infections in rodents, being a critical factor for assembling the innate immune response in the host (Thimmulappa *et al.*, 2006; Athale *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2016). Indeed, *M. hyopneumoniae* infection resulted in the up-regulation of several genes involved in glutathione and thioredoxin redox systems, and also of genes coding NADPH-regenerating enzymes, as analogously reported for activation of NRF2 targets in mice (Kensler *et al.*, 2007). Moreover, a number of antioxidant genes and genes coding for detoxification enzymes (such as the AKR gene family, NQO1 and GST) which were up-regulated during *M. hyopneumoniae* infection, were also reported to be activated by NRF2 (Kensler *et al.*, 2007). Under normal conditions, NRF2 is retained in the cytoplasm via its interaction to Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein) and it is subsequently ubiquitinated and degraded by the proteasome. In response to oxidative stress, reactive cysteines in Keap1 are modified, generating conformational changes in the complex formed by these proteins and releasing NRF2, which is translocated to the nucleus. In the nucleus, NRF2 can recognize and bind to antioxidant response element (ARE) motifs in the promoter region of target genes, activating their transcription (Nioi *et al.*, 2003; Kensler *et al.*, 2007; Biswal *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013). Conserved sequences similar to ARE consensus were detected in all putative target genes from this study.

One of the many compounds that can activate the NRF2/Keap1 pathway is hydrogen peroxide (Fourquet *et al.*, 2010). In our previous work, we identified that the pathogenic strains of *M. hyopneumoniae* were capable of producing hydrogen peroxide from glycerol metabolism, while the attenuated strain J could not produce this toxic product (Ferrarini *et al.*, 2018). However, novel analyses indicate that in conditions where glucose concentrations were scarce, this strain was also able to produce hydrogen peroxide (Supplementary Figure S3). These preliminary results show two specific cases: when maintained in minimum defined medium (as described in Ferrarini *et al.*, 2016), the attenuated strain produced a small amount of hydrogen peroxide, however when glycerol was the only energy source available, *M. hyopneumoniae* J produced this toxic product in concentrations similar to the ones produced by pathogenic strains of this species. The detection of hydrogen peroxide in the previously reported results (Ferrarini *et al.*, 2018) was performed in rich and complex Friis medium, indicating that the attenuated strain preferentially uses glucose when this carbohydrate is available; however, in adverse conditions, it is able to use glycerol as an energy source and thereby produce hydrogen peroxide. These results are also in accordance with the gene expression of the putative enzyme responsible for hydrogen peroxide production (glpO) in *M. hyopneumoniae* J, which did not differ from the pathogenic strains (Ferrarini *et al.* 2018).

During infection assays in general, bacteria need to compete with host cells for glucose and other energy sources. In our case, this condition could force *M. hyopneumoniae* J to consume small amounts of glycerol just as it happens when this strain is maintained in minimum defined medium. Thus, it is plausible to assume that during the infection assays, *M. hyopneumoniae* J produced hydrogen peroxide and this reactive oxygen species might have been one of the triggers that activated the transcription factor NRF2. Once again, it is reasonable to think that if we had used a highly pathogenic strain of *M. hyopneumoniae* in the infection assays (which produce higher concentrations of hydrogen peroxide in culture), we might have detected much more pronounced FCs in gene expression, possibly in response to a much higher production of hydrogen peroxide.

The analysis of the permissive interactions identified several miRNAs targeting NRF2 regulated genes (Figure 5). GGT1, for instance, is targeted by seven different miRNAs, while miR-31 is predicted to target four different genes induced by NRF2 (AKR1C4, AKR1CL1, GGT1 and TXNRD1). It was previously reported that NRF2 can be regulated independently of Keap1 by miRNAs in human breast cancer cells (Yang *et al.*, 2011). Our miRNA target prediction identified three miRNAs targeting NRF2: miR-340, miR-19a and miR-19b, all of them down-regulated in exosomes. Mir-340 has been previously identified negatively regulating NRF2 expression in human (Shi *et al.*, 2014). Our miRNA-mRNA target predictions identified that this miRNA could also be involved in the up-regulation of the transporter SLC6A6, a gene which was linked to a regulation by NRF2 in human (Cordova *et al.*, 2014). The other two miRNAs identified by our analyses as putative regulators of NRF2 (miR-19a and miR-19b), were also predicted to target GCLC, necessary for glutathione synthesis. MiR-19a and miR-19b have been reported to be down-regulated in the presence of hydrogen peroxide in rats (Xu *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2017), linking these miRNAs to a response to oxidative stress. In the literature, other miRNAs were also shown to negatively regulate the expression of NRF2: miR-101, miR-92a, miR-27b, miR-28 and miR-34a (Yang *et al.*, 2011; Alural *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). All of them were down-regulated in our data and were predicted by this study to regulate NRF2 target genes (Table 5). In this way, it seems that during *M. hyopneumoniae* infection, there is a global change in gene expression in an attempt to activate antioxidant genes, in association with the down-regulation of miRNAs that negatively regulate these genes.

It is interesting to observe (Figure 5, Table 5) that the miRNAs that regulate the genes of the NRF2 pathway are down-regulated only in extracellular or exosome samples, with no difference of expression in intracellular samples. This might suggest an attempt of the infected cells to signal neighboring cells of the importance of these genes, preventing their repression or degradation. This goes in accordance with the up-regulation of proteins involved in cell-cell communication, exosomes and extracellular vesicles from our results. And it becomes even more important due to the fact that exosomal miRNAs were already shown to regulate the inflammatory response in receptor cells from mice (Alexander *et al.*, 2015). While miRNAs identified in the extracellular total samples might contain sRNAs that reflect degradation remnants due to the presence of RNases and mRNAs in the extracellular environment, we believe that this does not happen in exosomes, since these vesicles have a membrane that protects their content from degradation. As exosomes have an important role in cell communication, we should consider the difference in miRNA expression in these vesicles as relevant and speculate on how they might interfere in the gene regulation of neighboring cells. In addition, as exosomes may also affect other cell types, they may contain miRNAs that target genes that are not DE in our samples.

Another aspect observed in our results was the increased expression of genes related to glycolysis, while genes related to apoptosis were down-regulated. These two effects might be related, as it has been identified that the expression of the pro-apoptotic gene PUMA (BBC3) is regulated by glucose metabolism (and high glucose consumption negatively regulated PUMA expression) (Zhao *et al.*, 2008). Interestingly, the up-regulation of genes related to energy metabolism might also be linked to NRF2, as this transcription factor was shown to increase energy metabolism while suppressing lipid synthesis (Vomhof-DeKrey and Picklo, 2012).

In general, the analysis of down-regulated genes identified many genes related to ciliary function, cytoskeleton and cell

cycle. It is known that *M. hyopneumoniae* attaches to cilia and promotes ciliostasis and loss of cilia, causing damage to the mucociliary apparatus (Debey and Ross, 1994; Young *et al.*, 2000). Our hypothesis is that one of the reasons for epithelial damage, besides physical adhesion, could be related to the change in gene expression induced by infection, which is a running hypothesis for at least two other epithelial pathogens from the genus *Mycobacterium* (Matsuyama *et al.*, 2018). In agreement with this hypothesis, we were able to identify the down-regulation of several genes coding for axonemal dyneins (the molecular motors responsible for cilia beating) (Kobayashi and Takeda, 2012), genes responsible for dynein assembly and transport (such as DYX1C1, LRRC6 and MS1), and genes involved in ciliogenesis and ciliary polarization (Zhou *et al.*, 2012; Tarkar *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Schueler *et al.*, 2015; Yasunaga *et al.*, 2015; Inaba *et al.*, 2016; May-Simera *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2018). Analyzing the repressive interactions of miRNAs and mRNAs, we identified genes coding dyneins as targets of several up-regulated miRNAs, with DNAL1 being target of seven different miRNAs. Mutations and down-regulation of genes coding ciliary proteins, especially dyneins, were related to primary ciliary dyskinesia (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2009; Milara *et al.*, 2010; Tarkar *et al.*, 2013; Schueler *et al.*, 2015; Inaba *et al.*, 2016), but had not yet been reported in *M. hyopneumoniae* infection. More investigations on this matter should be carried out, since it seems to be related to one of the main adverse effects caused by this bacterium.

Several cytoskeleton-related genes that play a role during cell division, such as BUB1B, CENP-I, NEK2 and SPAG5, were down-regulated during infection. Many of these genes are involved with the mitotic spindle and chromosome segregation (Mack and Compton, 2001; Kim *et al.*, 2002; Woolner *et al.*, 2008; Bolanos-Garcia and Blundell, 2011; Wolter *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Matson and Stukenberg, 2014; Wadsworth, 2015). Genes encoding microtubule-dependent motor proteins that physically affect chromosome segregation, such as kinesins (usually up-regulated during mitosis) (Cho *et al.*, 2001), as well as genes related to cell cycle progression were also down-regulated during infection. Taken together, these results suggest a repression of cell division. The manipulation of cell cycle by pathogens was extensively reported, with different pathogens being able to arrest different points of the cell cycle (Shirin *et al.*, 1999; Marches *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007; Alekseeva *et al.*, 2013). Therefore, it is possible that *M. hyopneumoniae* infection interferes with the host cell cycle.

A disruption of genes encoding cytoskeletal proteins may also be related to activation of NRF2. To keep this transcription factor in the cytoplasm, the protein Keap1 associates with actin filaments. Kang and collaborators (2004) observed that the actin cytoskeleton is a scaffold necessary to maintain NRF2 in the cytoplasm, and that disruption of the actin filament network releases NRF2 from Keap1, resulting in the translocation of the transcription factor to the nucleus. Moreover, recently, Raymond and collaborators (2018) showed that extracellular actin is a receptor for *M. hyopneumoniae* in PK-15 epithelial cells and that fragments of adhesin P97 bind specifically to actin. In this way, the changes in gene expression of cytoskeleton-related genes might be another indication of the NRF2 induction of antioxidant genes by *M. hyopneumoniae*.

In this work, we analyzed the changes that *M. hyopneumoniae* produced in gene and miRNA expression in tracheal epithelial cells. However, we are aware that infection with this species involves a large component of the immune system, which is even said to be responsible for the major tissue damage related to the infection. Thus, the results found here reflect the effect of *M. hyopneumoniae* on epithelial cells, while the general picture of the respiratory tract might present different responses to the infection. In this way, it is important to observe that besides the hydrogen peroxide production by *M. hyopneumoniae*, other factors can trigger the activation of the cell antioxidant defense during infection. *M. hyopneumoniae* infection is characterized by the infiltration of a large number of leukocytes in the lung tissue, which produce reactive oxygen and nitrogen species, causing tissue damage (Muneta *et al.*, 2008; Biswal *et al.*, 2012). Accordingly, systemic infections with *M. hyopneumoniae* have a great potential of causing oxidative stress, so that the transcription of genes activated by NRF2 seem to be important to fight the infection and maintain cellular homeostasis.

In conclusion, we conducted the first study that analyzes mRNA and miRNAs differential expression in epithelial tracheal cells infected with *M. hyopneumoniae* by NGS. Our results bring new insights on the interaction between *M. hyopneumoniae* and the swine host, notably the efforts of the cells to activate genes related to antioxidant response, and leave several perspectives related to the pathogenicity of this bacterial species.

Methods

Cultivation of NPTr cells

NPTr cells (Ferrari *et al.*, 2002), purchased from Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy, were grown in Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts (MEM/EBSS) and 2 mM L-Glutamine (GE Healthcare) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (GE Healthcare). Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ in a humid atmosphere in T75 flasks and 6-well tissue culture plates. Sub-passages were made when cells reached 80-100% confluence. To isolate exosome vesicles, the culture medium was removed, confluent cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and kept in medium without FBS and antibiotics (exosome depleted) for 48h.

Infection of NPTr cells with *M. hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae J (ATCC®25934) was cultivated in 2 mL of Friis medium (Friis, 1975) at 37°C for 48h with gentle agitation in a roller drum. Prior to NPTr infection, *Mycoplasma* cells were pelleted, washed with PBS and resuspended in MEM/EBSS medium. For the immunofluorescence experiments, 5 mL of *M. hyopneumoniae* culture were used to infect each slide coverslip grown with NPTr cells. For the RNA extraction experiments, 2 mL of *M. hyopneumoniae* culture were used to infect each well in a 6-well tissue plate and 10 mL of the bacterial culture were used to infect NPTr cells in F75 cm² flasks. NPTr cells were challenged with *M. hyopneumoniae* for 24 h.

Immunofluorescence

NPTr cells were grown in cover slips coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) for 48 h and infected or not-infected with *M. hyopneumoniae* for 24 h. The cells were washed with 1x PBS three times and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min. After permeabilization with 0.2% Triton X-100 for 10 min and blocking with 4% BSA in PBS for 20 min, the cells were incubated with the primary antibodies (rabbit polyclonal anti-SPase I of *M. hyopneumoniae*, 1:10,000 and mouse monoclonal anti-Sodium/Potassium ATPase alpha, 1:20, Invitrogen) for 1 h at 37°C followed by secondary antibodies (Alexa Fluor488-conjugated anti-rabbit, 1:1,000, Invitrogen and Alexa Fluor555-conjugated anti-mouse, 1:1,000, Invitrogen) incubation for 1 h in the dark. The cells were washed with PBS and the DNA was stained with 0.2µg/mL DAPI for 20 min. The slides were mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich) and all samples were imaged using a fluorescent microscope (Zeiss AxioImager Z1).

Exosome extraction

Exosomes were purified from 250 mL of NPTr conditioned medium (as described by Forterre *et al.*, 2014). Briefly, after 48 hours of incubation the medium was recovered and cell debris and organelles were eliminated by centrifugation at 2,000 x g for 20 min and at 10,000 x g for 30 min. The resulting supernatant was filtered through a 0.22µm filter in order to remove large particles. Exosome vesicles were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 x g for 90 min 4°C (Beckman-Coulter, Optima™ MAX-XP ultracentrifuge, MLA-55 rotor). The supernatant was recovered and saved for posterior use (SN) and the exosome sediment was washed with 25 mL of cold PBS, centrifuged at 100,000 x g for 70 min 4°C and resuspended in 50µL PBS. Exosome extractions were performed in duplicates in both conditions of NPTr cells non-infected and infected with *M. hyopneumoniae*. SN portion was submitted to nucleic acid precipitation with 1/10 volume of 3M sodium acetate and 3 volumes of 100% cold ethanol at -20°C overnight. After centrifugation, the nucleic acid precipitated was allowed to dry at 60°C for 1 hour and was resuspended in 100µL of ultrapure RNase free water.

Sample preparation, RNA extraction and sequencing

For mRNA sequencing, a total of 6 samples were prepared: 3 in a control group (CTL) and 3 in the infected group (INF). For miRNA sequencing, we prepared the samples as follows: total intracellular miRNA (INTRA: 3 CTL vs 3 INF), total extracellular small RNA (EXTRA: 2 CTL vs 2 INF), extracellular exosomal miRNA (EXO: 1 pool CTL vs 1 pool INF) and extracellular miRNA from vesicle-free supernatant (SN: 1 pool CTL vs 1 pool INF). Total RNA for mRNA sequencing and sRNA sequencing (< 200bp) for miRNA analyses was extracted with mirVana kit (Ambion), according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed with Bioanalyzer 2100 (Agilent Genomics). A total of 6 mRNA libraries were prepared (one for each sample) using TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation kit (Illumina) and a total of 14 small RNA libraries were prepared using TruSeq Small RNA Sample Prep kit (Illumina). After quality control, the sequencing of all libraries was performed by HiSeq2500 platform (Illumina). RNA library preparation and sequencing was performed by the Duke University GCB Sequencing Platform (Durham, USA).

Computational analysis of sequencing data

Preprocessing of raw reads

The raw reads were filtered for low quality reads, and adapter sequences were trimmed with CUTADAPT (Martin, 2011). Clean reads were mapped against the porcine reference genome from Ensembl (Sscrofa10.2) with STAR (Dobin *et al.*, 2013) and raw counts of genes were obtained with HTSeq count (Anders *et al.*, 2015). Only uniquely mapped reads were used for further analyses.

For miRNA prediction, we used intracellular samples as input for miRDeep2 (Friedlander *et al.*, 2012) and kept predictions that had a score of at least 5. After this, we collapsed similar predictions and obtained a total of 773 clusters (773 putative miRNAs). We created a porcine miRNA DB, by including the 411 annotated porcine miRNAs in version 21 of miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Kozomara and Griffiths-Jones, 2014) along with 722 miRNAs characterized by Martini and collaborators (2014). Reads from all samples were mapped against this database and a matrix of counts was generated.

Differential expression of mRNA data

Raw counts were used as input for differentially expressed (DE) gene analysis. We detected possible DE genes in both EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) and DESeq2 (Love *et al.*, 2014) packages in R. DESeq2 was run for genes that had a total count of at least 10 in all libraries, with the method's default normalization. EdgeR was used with TMM normalization and general linear model fit, only for genes with cpm greater than 1 in at least 2 libraries. After testing, p-values for both methods were adjusted with Benjamin-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) correction for multitesting. Genes were considered DE when $p < 0.05$ and were selected for further investigation when log of FC (LogFC) was greater than 0.4 (for up-regulated genes) or smaller than -0.4 (for down-regulated genes). The selection of candidates for detailed analysis and experimental testing took into account genes that were detected as DE by both methods. For functional analyses, we also used the complete list of DE genes whenever LogFC was greater than 0.1 (up-regulated) or smaller than -0.1 (down-regulated). These complete lists from each method were used separately, and we compared the overall outcomes to check the robustness of our results.

Differential expression of miRNA data

The same pipeline used for DE mRNA was performed for total intracellular and total extracellular miRNAs, since we had biological replicates in both cases. In the case where we had no replicates (instead, a single library was constructed from a pool of 50 biological replicates), we used a tool called GFOLD (Feng *et al.*, 2012) which provides a generalized fold change for ranking DE genes. GFOLD is said to overcome the shortcomings of p-value and FC of existing methods and can provide a more stable and biological meaningful gene ranking when a single biological replicate is available. In this case, we selected miRNAs with GFOLD > 2 or < -2 for functional analyses.

miRNA target prediction

DE miRNAs were used as input for target predictions in the porcine genome. We used three methods to detect target pairs: miRanda (Betel *et al.*, 2010), TargetScan (Lewis *et al.*, 2003) and PITA (Kertesz *et al.*, 2007); and one method to validate the hybridization of a target pair, RNAhybrid (Kruger *et al.*, 2006). We kept only targets that were predicted by at least two distinct tools and used the following thresholds: score in miRanda > 140 , DDG from PITA < -5 , score in RNAhybrid < -15 . Since TargetScan does not provide a continuous scoring system, we only validated whenever there was a prediction of at least 6mers. Based on these, we chose from the putative target list only genes that were detected as DE in this study, and subsequently we only considered target pairs of miRNA-mRNA that had inversed fold change expression.

Functional analysis

Functional analysis took into account as input either the list of DE mRNAs itself or the list of targets predicted for the DE miRNAs. We performed GO enrichment analysis (Ashburner *et al.*, 2000) to find out which functions were over or underrepresented in each gene list. P-values for enriched GO terms were adjusted with Benjamin-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) correction for multitesting. GO terms and pathways with $p < 0.05$ were defined as significantly enriched. The GO terms were reduced to representative non redundant terms with the use of the REVIGO tool (Supek *et al.*, 2011).

RT-qPCR of selected differentially expressed mRNAs

For RT-qPCR, total RNA of NPTr cells infected and non-infected with *M. hyopneumoniae* was isolated with TRizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A first-strand cDNA synthesis reaction was conducted by adding 1 μ g of total RNA to 500ng of oligo(dT)15 primer (Promega) and 10 mM deoxynucleotide triphosphates. The mixture was heated for 65°C for 5 min and then incubated on ice for 5 min. First-strand buffer (Invitrogen), 0.1 M dithiothreitol and 200 U M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase – Invitrogen) were then added to a total volume of 20 μ L. The reaction was incubated at 25°C for 10 min and at 37°C for 50 min followed by 15 min at 70°C for enzyme inactivation. Quantitative PCR (qPCR) assay was performed using 1:5 cDNA as template and Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) with specific primers (Supplementary Table S13) on 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). The qPCR reactions were carried out at 90°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. A melting curve analysis was done to verify the specificity of the synthesized products and the amplification efficiency for each primer was calculated with the LinRegPCR software application (Rujiter *et al.*, 2009). The mRNA levels were normalized against porcine DNA topoisomerase II beta (TOP2B) and the relative expression of mRNA was calculated by 2- $\Delta\Delta$ CT method. The threshold cycle (CT) of each target test represents the average of three reactions. Three independent biological replicates were done for each target gene. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 software with a two-tailed unpaired t-test to compare the relative expression between infected and non-infected NPTr cells ($p < 0.05$).

References

- Alekseeva et al. , 2013.** Alekseeva, L., Rault, L., Almeida, S., Legembre, P., Edmond, V., Azevedo, V., Miyoshi, A., Even, S., Taieb, F., Arlot-Bonnemains, Y., Le Loir, Y., & Berkova, N. 2013. *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency. *PLoS ONE*, **8**(5), e63279.
- Alexander et al. , 2015.** Alexander, M., Hu, R., Runtsch, M. C., Kagele, D. A., Mosbrugger, T. L., Tolmacheva, T., Seabra, M. C., Round, J. L., Ward, D. M., & O'Connell, R. M. 2015. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun*, **6**(Jun), 7321.
- Alural et al. , 2015.** Alural, B., Ozerdem, A., Allmer, J., Genc, K., & Genc, S. 2015. Lithium protects against paraquat neurotoxicity by NRF2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. *Front Cell Neurosci*, **9**, 209.
- Anders et al. , 2015.** Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **31**(2), 166–169.
- Ashburner et al. , 2000.** Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, **25**(1), 25–29.
- Athale et al. , 2012.** Athale, J., Ulrich, A., MacGarvey, N. C., Bartz, R. R., Welty-Wolf, K. E., Suliman, H. B., & Piantadosi, C. A. 2012. Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **53**(8), 1584–1594.
- Bao et al. , 2015.** Bao, H., Kommadath, A., Liang, G., Sun, X., Arantes, A. S., Tuggle, C. K., Bearson, S. M., Plastow, G. S., Stothard, P., & Guan, I. e. L. 2015. Genome-wide whole blood microRNAome and transcriptome analyses reveal miRNA-mRNA regulated host response to foodborne pathogen *Salmonella* infection in swine. *Sci Rep*, **5**(Jul), 12620.
- Bartel, 2004.** Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**(2), 281–297.
- Bartel & Chen, 2004.** Bartel, D. P., & Chen, C. Z. 2004. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.*, **5**(5), 396–400.
- Benjamini & Hochberg, 1995.** Benjamini, Yoav, & Hochberg, Yosef. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **57**(1), 289–300.
- Betel et al. , 2010.** Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., & Leslie, C. 2010. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.*, **11**(8), R90.
- Biswal et al. , 2012.** Biswal, S., Thimmulappa, R. K., & Harvey, C. J. 2012. Experimental therapeutics of Nrf2 as a target for prevention of bacterial exacerbations in COPD. *Proc Am Thorac Soc*, **9**(2), 47–51.
- Bolanos-Garcia & Blundell, 2011.** Bolanos-Garcia, V. M., & Blundell, T. L. 2011. BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem. Sci.*, **36**(3), 141–150.
- Brzoska et al. , 2014.** Brzoska, K., Stapkowski, T. M., & Kruszewski, M. 2014. Basal PIR expression in HeLa cells is driven by NRF2 via evolutionary conserved antioxidant response element. *Mol. Cell. Biochem.*, **389**(1-2), 99–111.
- Chatr-Aryamontri et al. , 2017.** Chatr-Aryamontri, A., Oughtred, R., Boucher, L., Rust, J., Chang, C., Kolas, N. K., O'Donnell, L., Oster, S., Theesfeld, C., Sellam, A., Stark, C., Breitkreutz, B. J., Dolinski, K., & Tyers, M. 2017. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.*, **45**(D1), D369–D379.
- Chen et al. , 2014.** Chen, L., Charrier, A., Zhou, Y., Chen, R., Yu, B., Agarwal, K., Tsukamoto, H., Lee, L. J., Paulaitis, M. E., & Brigstock, D. R. 2014. Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology*, **59**(3), 1118–1129.
- Cheng et al. , 2012.** Cheng, Y., Kuang, W., Hao, Y., Zhang, D., Lei, M., Du, L., Jiao, H., Zhang, X., & Wang, F. 2012. Downregulation of miR-27a* and miR-532-5p and upregulation of miR-146a and miR-155 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. *Inflammation*, **35**(4), 1308–1313.
- Cho et al. , 2006.** Cho, H. Y., Reddy, S. P., & Kleeberger, S. R. 2006. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**(1-2), 76–87.
- Cho et al. , 2001.** Cho, R. J., Huang, M., Campbell, M. J., Dong, H., Steinmetz, L., Sapinoso, L., Hampton, G., Elledge, S. J., Davis, R. W., & Lockhart, D. J. 2001. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat. Genet.*, **27**(1), 48–54.

- Ciprian et al. , 1988.** Ciprian, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R., & de la Garza, M. 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can. J. Vet. Res.*, **52**(4), 434–438.
- Cordova et al. , 2014.** Cordova, E. J., Martinez-Hernandez, A., Uribe-Figueroa, L., Centeno, F., Morales-Marin, M., Koneru, H., Coleman, M. A., & Orozco, L. 2014. The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. *PLoS ONE*, **9**(2), e88069.
- Dai et al. , 2015.** Dai, L. L., Gao, J. X., Zou, C. G., Ma, Y. C., & Zhang, K. Q. 2015. mir-233 modulates the unfolded protein response in *C. elegans* during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS Pathog.*, **11**(1), e1004606.
- DeBey & Ross, 1994.** DeBey, M. C., & Ross, R. F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.*, **62**(12), 5312–5318.
- Derrick et al. , 2013.** Derrick, T., Roberts, C. h., Rajasekhar, M., Burr, S. E., Joof, H., Makalo, P., Bailey, R. L., Mabey, D. C., Burton, M. J., & Holland, M. J. 2013. Conjunctival MicroRNA expression in inflammatory trachomatous scarring. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**(3), e2117.
- Derrick et al. , 2016.** Derrick, T., Last, A. R., Burr, S. E., Roberts, C. H., Nabicassa, M., Cassama, E., Bailey, R. L., Mabey, D. C., Burton, M. J., & Holland, M. J. 2016. Inverse relationship between microRNA-155 and -184 expression with increasing conjunctival inflammation during ocular *Chlamydia trachomatis* infection. *BMC Infect. Dis.*, **16**(Feb), 60.
- Derrick et al. , 2017.** Derrick, T., Ramadhani, A. M., Mtengai, K., Massae, P., Burton, M. J., & Holland, M. J. 2017. miRNAs that associate with conjunctival inflammation and ocular *Chlamydia trachomatis* infection do not predict progressive disease. *Pathog Dis*, **75**(2).
- Djordjevic et al. , 2004.** Djordjevic, S. P., Cordwell, S. J., Djordjevic, M. A., Wilton, J., & Minion, F. C. 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect. Immun.*, **72**(5), 2791–2802.
- Dobin et al. , 2013.** Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29**(1), 15–21.
- Duval et al. , 2017.** Duval, M., Cossart, P., & Lebreton, A. 2017. Mammalian microRNAs and long noncoding RNAs in the host-bacterial pathogen crosstalk. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **65**(05), 11–19.
- Feng et al. , 2012.** Feng, J., Meyer, C. A., Wang, Q., Liu, J. S., Shirley Liu, X., & Zhang, Y. 2012. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, **28**(21), 2782–2788.
- Fernandez-Gonzalez et al. , 2009.** Fernandez-Gonzalez, A., Kourembanas, S., Wyatt, T. A., & Mitsialis, S. A. 2009. Mutation of murine adenylate kinase 7 underlies a primary ciliary dyskinesia phenotype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **40**(3), 305–313.
- Ferrari et al. , 2003.** Ferrari, M., Scalvini, A., Losio, M. N., Corradi, A., Soncini, M., Bignotti, E., Milanese, E., Ajmone-Marsan, P., Barlati, S., Bellotti, D., & Tonelli, M. 2003. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J. Virol. Methods*, **107**(2), 205–212.
- Ferrarini et al. , 2016.** Ferrarini, M. G., Siqueira, F. M., Mucha, S. G., Palama, T. L., Jobard, E., Elena-Herrmann, B., R Vasconcelos, A. T., Tardy, F., Schrank, I. S., Zaha, A., & Sagot, M. F. 2016. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics*, **17**(05), 353.
- Ferrarini et al. , 2018.** Ferrarini, M.G., Mucha, S. G., Parrot, D., Meiffrein, G., Ruggiero Bachega, J. F., Comte, G., Zaha, A., & Sagot, M. F. 2018. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **108**(6), 683–696.
- Forterre et al. , 2014.** Forterre, A., Jalabert, A., Chikh, K., Pesenti, S., Euthine, V., Granjon, A., Errazuriz, E., Lefai, E., Vidal, H., & Rome, S. 2014a. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle*, **13**(1), 78–89.
- Fourquet et al. , 2010.** Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D., & Toledano, M. B. 2010. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H2O2 involves KEAP1 disulfide formation. *J. Biol. Chem.*, **285**(11), 8463–8471.
- Friedlander et al. , 2012.** Friedlander, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. 2012. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.*, **40**(1), 37–52.
- Gao et al. , 2017.** Gao, A. M., Zhang, X. Y., & Ke, Z. P. 2017. Apigenin sensitizes BEL-7402/ADM cells to doxorubicin through inhibiting miR-101/Nrf2 pathway. *Oncotarget*, **8**(47), 82085–82091.
- Gomez et al. , 2016.** Gomez, J. C., Dang, H., Martin, J. R., & Doerschuk, C. M. 2016. Nrf2 Modulates Host Defense during *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia in Mice. *J. Immunol.*, **197**(7), 2864–2879.

- Graham et al. , 2018.** Graham, D. B., Jasso, G. J., Mok, A., Goel, G., Ng, A. C. Y., Kolde, R., Varma, M., Doench, J. G., Root, D. E., Clish, C. B., Carr, S. A., & Xavier, R. J. 2018. Nitric Oxide Engages an Anti-inflammatory Feedback Loop Mediated by Peroxiredoxin 5 in Phagocytes. *Cell Rep*, **24**(4), 838–850.
- Griffiths-Jones, 2004.** Griffiths-Jones, S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.*, **32**(Database issue), D109–111.
- Ha Kim et al. , 2002.** Ha Kim, Y., Yeol Choi, J., Jeong, Y., Wolgemuth, D. J., & Rhee, K. 2002. Nek2 localizes to multiple sites in mitotic cells, suggesting its involvement in multiple cellular functions during the cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**(2), 730–736.
- Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.** Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, **39**(4), 199–218.
- Hayes & McMahon, 2009.** Hayes, J. D., & McMahon, M. 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem. Sci.*, **34**(4), 176–188.
- Hong et al. , 2017.** Hong, J., Wang, Y., Hu, B. C., Xu, L., Liu, J. Q., Chen, M. H., Wang, J. Z., Han, F., Zheng, Y., Chen, X., Li, Q., Yang, X. H., Sun, R. H., & Mo, S. J. 2017. Transcriptional downregulation of microRNA-19a by ROS production and NF- κ B deactivation governs resistance to oxidative stress-initiated apoptosis. *Oncotarget*, **8**(41), 70967–70981.
- Inaba et al. , 2016.** Inaba, Y., Shinohara, K., Botilde, Y., Nabeshima, R., Takaoka, K., Ajima, R., Lamri, L., Takeda, H., Saga, Y., Nakamura, T., & Hamada, H. 2016. Transport of the outer dynein arm complex to cilia requires a cytoplasmic protein Lrrc6. *Genes Cells*, **21**(7), 728–739.
- Jones et al. , 2007.** Jones, A., Jonsson, A. B., & Aro, H. 2007. *Neisseria gonorrhoeae* infection causes a G1 arrest in human epithelial cells. *FASEB J.*, **21**(2), 345–355.
- Kang et al. , 2004.** Kang, M. I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S. G., & Yamamoto, M. 2004. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(7), 2046–2051.
- Kensler et al. , 2007.** Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 89–116.
- Kertesz et al. , 2007.** Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., & Segal, E. 2007. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.*, **39**(10), 1278–1284.
- Kim & Nam, 2006.** Kim, V. N., & Nam, J. W. 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet.*, **22**(3), 165–173.
- Kobayashi & Takeda, 2012.** Kobayashi, D., & Takeda, H. 2012. Ciliary motility: the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation*, **83**(2), S23–29.
- Kozomara & Griffiths-Jones, 2014.** Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, **42**(Database issue), 68–73.
- Kruger & Rehmsmeier, 2006.** Kruger, J., & Rehmsmeier, M. 2006. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.*, **34**(Web Server issue), W451–454.
- Lawless et al. , 2013.** Lawless, N., Ferooshani, A. B., McCabe, M. S., O’Farrelly, C., & Lynn, D. J. 2013. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. *PLoS ONE*, **8**(3), e57543.
- Lewis et al. , 2003.** Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, **115**(7), 787–798.
- Li et al. , 2015.** Li, D., Ma, S., & Ellis, E. M. 2015. Nrf2-mediated adaptive response to methyl glyoxal in HepG2 cells involves the induction of AKR7A2. *Chem. Biol. Interact.*, **234**(Jun), 366–371.
- Li et al. , 2012.** Li, N., Xu, X., Xiao, B., Zhu, E. D., Li, B. S., Liu, Z., Tang, B., Zou, Q. M., Liang, H. P., & Mao, X. H. 2012. *H. pylori* related proinflammatory cytokines contribute to the induction of miR-146a in human gastric epithelial cells. *Mol. Biol. Rep.*, **39**(4), 4655–4661.
- Liang et al. , 2016.** Liang, G., Malmuthuge, N., Guan, Y., Ren, Y., Griebel, P. J., & Guan, I. e. L. 2016. Altered microRNA expression and pre-mRNA splicing events reveal new mechanisms associated with early stage *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Sci Rep*, **6**(04), 24964.
- Lim et al. , 2005.** Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., & Johnson, J. M. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**(7027), 769–773.

- Liu et al. , 2017.** Liu, H., Wu, H. Y., Wang, W. Y., Zhao, Z. L., Liu, X. Y., & Wang, L. Y. 2017. Regulation of miR-92a on vascular endothelial aging via mediating Nrf2-KEAP1-ARE signal pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **21**(11), 2734–2742.
- Liu et al. , 2010.** Liu, Z., Xiao, B., Tang, B., Li, B., Li, N., Zhu, E., Guo, G., Gu, J., Zhuang, Y., Liu, X., Ding, H., Zhao, X., Guo, H., Mao, X., & Zou, Q. 2010. Up-regulated microRNA-146a negatively modulate *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. *Microbes Infect.*, **12**(11), 854–863.
- Liu et al. , 2013.** Liu, Z., Wang, D., Hu, Y., Zhou, G., Zhu, C., Yu, Q., Chi, Y., Cao, Y., Jia, C., & Zou, Q. 2013. MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *J. Gastroenterol.*, **48**(1), 86–92.
- Love et al. , 2014.** Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **15**(12), 550.
- Luo et al. , 2017.** Luo, Y., Wang, P., Wang, X., Wang, Y., Mu, Z., Li, Q., Fu, Y., Xiao, J., Li, G., Ma, Y., Gu, Y., Jin, L., Ma, J., Tang, Q., Jiang, A., Li, X., & Li, M. 2017. Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs. *Sci Rep*, **7**(1), 645.
- Ma et al. , 2013.** Ma, X., You, X., Zeng, Y., He, J., Liu, L., Deng, Z., Jiang, C., Wu, H., Zhu, C., Yu, M., & Wu, Y. 2013. *Mycoplasma fermentans* MALP-2 induces heme oxygenase-1 expression via mitogen-activated protein kinases and Nrf2 pathways to modulate cyclooxygenase 2 expression in human monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.*, **20**(6), 827–834.
- Mack & Compton, 2001.** Mack, G. J., & Compton, D. A. 2001. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**(25), 14434–14439.
- Maes et al. , 1996.** Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., & de Kruijff, A. 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q*, **18**(3), 104–109.
- Maes et al. , 2018.** Maes, D., Sibila, M., Kuhnert, P., Segales, J., Haesebrouck, F., & Pieters, M. 2018. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis*, **65 Suppl 1**(May), 110–124.
- Marches et al. , 2003.** Marches, O., Ledger, T. N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M., De Rycke, J., & Oswald, E. 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.*, **50**(5), 1553–1567.
- Martin, 2011.** Martin, Marcel. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB-net.journal*, **17**(1), 10+.
- Martini et al. , 2014.** Martini, P., Sales, G., Brugiolo, M., Gandaglia, A., Naso, F., De Pitta, C., Spina, M., Gerosa, G., Chemello, F., Romualdi, C., Cagnin, S., & Lanfranchi, G. 2014. Tissue-specific expression and regulatory networks of pig microRNAome. *PLoS ONE*, **9**(4), e89755.
- Matson & Stukenberg, 2014.** Matson, D. R., & Stukenberg, P. T. 2014. CENP-I and Aurora B act as a molecular switch that ties RZZ/Mad1 recruitment to kinetochore attachment status. *J. Cell Biol.*, **205**(4), 541–554.
- Matsushima et al. , 2011.** Matsushima, K., Isomoto, H., Inoue, N., Nakayama, T., Hayashi, T., Nakayama, M., Nakao, K., Hirayama, T., & Kohno, S. 2011. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Int. J. Cancer*, **128**(2), 361–370.
- Matsuyama et al. , 2018.** Matsuyama, M., Martins, A. J., Shallom, S., Kamenyeva, O., Kashyap, A., Sampaio, E. P., Kabat, J., Olivier, K. N., Zelazny, A. M., Tsang, J. S., & Holland, S. M. 2018. Transcriptional Response of Respiratory Epithelium to Nontuberculous Mycobacteria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **58**(2), 241–252.
- Maudet et al. , 2014.** Maudet, C., Mano, M., & Eulalio, A. 2014. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Lett.*, **588**(22), 4140–4147.
- May-Simera et al. , 2016.** May-Simera, H. L., Gumerson, J. D., Gao, C., Campos, M., Cologna, S. M., Beyer, T., Boldt, K., Kaya, K. D., Patel, N., Kretschmer, F., Kelley, M. W., Petralia, R. S., Davey, M. G., & Li, T. 2016. Loss of MACF1 Abolishes Ciliogenesis and Disrupts Apicobasal Polarity Establishment in the Retina. *Cell Rep*, **17**(5), 1399–1413.
- Milara et al. , 2010.** Milara, J., Armengot, M., Mata, M., Morcillo, E. J., & Cortijo, J. 2010. Role of adenylate kinase type 7 expression on cilia motility: possible link in primary ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy*, **24**(3), 181–185.
- Muneta et al. , 2008.** Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., Ogawa, Y., Hikono, H., & Mori, Y. 2008. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.*, **70**(10), 1065–1070.

- Muxel et al. , 2017.** Muxel, S. M., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., & Floeter-Winter, L. M. 2017. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci Rep*, **7**(03), 44141.
- Naqvi et al. , 2015.** Naqvi, A. R., Fordham, J. B., & Nares, S. 2015. miR-24, miR-30b, and miR-142-3p regulate phagocytosis in myeloid inflammatory cells. *J. Immunol.*, **194**(4), 1916–1927.
- Nioi et al. , 2003.** Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J. D. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem. J.*, **374**(Pt 2), 337–348.
- Noto et al. , 2013.** Noto, J. M., Piazuolo, M. B., Chaturvedi, R., Bartel, C. A., Thatcher, E. J., Delgado, A., Romero-Gallo, J., Wilson, K. T., Correa, P., Patton, J. G., & Peek, R. M. 2013. Strain-specific suppression of microRNA-320 by carcinogenic *Helicobacter pylori* promotes expression of the antiapoptotic protein Mcl-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **305**(11), G786–796.
- Podolska et al. , 2012.** Podolska, A., Anthon, C., Bak, M., Tommerup, N., Skovgaard, K., Heegaard, P. M., Gorodkin, J., Cirera, S., & Fredholm, M. 2012. Profiling microRNAs in lung tissue from pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics*, **13**(Sep), 459.
- Rana et al. , 2012.** Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zoller, M. 2012. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**(9), 1574–1584.
- Raymond et al. , 2018.** Raymond, B. B. A., Madhkoor, R., Schleicher, I., Uphoff, C. C., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Rohde, M., Padula, M. P., & Djordjevic, S. P. 2018. Extracellular Actin Is a Receptor for *Mycoplasma hypopneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.*, **8**, 54.
- Reddy et al. , 2009.** Reddy, N. M., Suryanarayana, V., Kalvakolanu, D. V., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Hassoun, P. M., Kleeberger, S. R., & Reddy, S. P. 2009. Innate immunity against bacterial infection following hyperoxia exposure is impaired in NRF2-deficient mice. *J. Immunol.*, **183**(7), 4601–4608.
- Reszka et al. , 2013.** Reszka, E., Jablonowski, Z., Wieczorek, E., Gromadzinska, J., Jablonska, E., Sosnowski, M., & Wasowicz, W. 2013. Expression of NRF2 and NRF2-modulated genes in peripheral blood leukocytes of bladder cancer males. *Neoplasma*, **60**(2), 123–128.
- Rice et al. , 2000.** Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.*, **16**(6), 276–277.
- Robinson et al. , 2010.** Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**(1), 139–140.
- Rome, 2013.** Rome, S. 2013. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? *Clin. Biochem.*, **46**(10-11), 937–945.
- Ruijter et al. , 2009.** Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., & Moorman, A. F. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.*, **37**(6), e45.
- Schorey et al. , 2015.** Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.*, **16**(1), 24–43.
- Schueler et al. , 2015.** Schueler, M., Braun, D. A., Chandrasekar, G., Gee, H. Y., Klasson, T. D., Halbritter, J., Bieder, A., Porath, J. D., Airik, R., Zhou, W., LoTurco, J. J., Che, A., Otto, E. A., Bockenbauer, D., Sebire, N. J., Honzik, T., Harris, P. C., Koon, S. J., Gunay-Aygun, M., Saunier, S., Zerres, K., Bruechle, N. O., Drenth, J. P., Pelletier, L., Tapia-Paez, I., Lifton, R. P., Giles, R. H., Kere, J., & Hildebrandt, F. 2015. DCDC2 mutations cause a renal-hepatic ciliopathy by disrupting Wnt signaling. *Am. J. Hum. Genet.*, **96**(1), 81–92.
- Shi et al. , 2014.** Shi, L., Chen, Z. G., Wu, L. L., Zheng, J. J., Yang, J. R., Chen, X. F., Chen, Z. Q., Liu, C. L., Chi, S. Y., Zheng, J. Y., Huang, H. X., Lin, X. Y., & Zheng, F. 2014. miR-340 reverses cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting Nrf2-dependent antioxidant pathway. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **15**(23), 10439–10444.
- Shi et al. , 2018.** Shi, L., Koll, F., Arnaiz, O., & Cohen, J. 2018. The Ciliary Protein IFT57 in the Macronucleus of *Paramecium*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **65**(1), 12–27.
- Shirin et al. , 1999.** Shirin, H., Sordillo, E. M., Oh, S. H., Yamamoto, H., Delohery, T., Weinstein, I. B., & Moss, S. F. 1999. *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res.*, **59**(10), 2277–2281.

- Siddle et al. , 2015.** Siddle, K. J., Tailleux, L., Deschamps, M., Loh, Y. H., Deluen, C., Gicquel, B., Antoniewski, C., Barreiro, L. B., Farinelli, L., & Quintana-Murci, L. 2015. bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and their isomiRs. *PLoS Genet.*, **11**(3), e1005064.
- Silverman & Reiner, 2011.** Silverman, J. M., & Reiner, N. E. 2011. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell. Microbiol.*, **13**(1), 1–9.
- Siqueira et al. , 2016.** Siqueira, F. M., de Moraes, G. L., Higashi, S., Beier, L. S., Breyer, G. M., de Sa Godinho, C. P., Sagot, M. F., Schrank, I. S., Zaha, A., & de Vasconcelos, A. T. 2016. Mycoplasma non-coding RNA: identification of small RNAs and targets. *BMC Genomics*, **17**(Suppl 8), 743.
- Staedel & Darfeuille, 2013.** Staedel, C., & Darfeuille, F. 2013. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell. Microbiol.*, **15**(9), 1496–1507.
- Stark et al. , 2006.** Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., & Tyers, M. 2006. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.*, **34**(Database issue), D535–539.
- Supek et al. , 2011.** Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N., & Smuc, T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, **6**(7), e21800.
- Tarkar et al. , 2013.** Tarkar, A., Loges, N. T., Slagle, C. E., Francis, R., Dougherty, G. W., Tamayo, J. V., Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., Olbrich, H., Werner, C., Raidt, J., Pennekamp, P., Abouhamed, M., Hjeij, R., Kohler, G., Griese, M., Li, Y., Lemke, K., Klena, N., Liu, X., Gabriel, G., Tobita, K., Jaspers, M., Morgan, L. C., Shapiro, A. J., Letteboer, S. J., Mans, D. A., Carson, J. L., Leigh, M. W., Wolf, W. E., Chen, S., Lucas, J. S., Onoufriadis, A., Plagnol, V., Schmidts, M., Boldt, K., Roepman, R., Zariwala, M. A., Lo, C. W., Mitchison, H. M., Knowles, M. R., Burdine, R. D., Loturco, J. J., & Omran, H. 2013. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat. Genet.*, **45**(9), 995–1003.
- Thimmulappa et al. , 2006.** Thimmulappa, R. K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S. P., Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Biswal, S. 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.*, **116**(4), 984–995.
- Valadi et al. , 2007.** Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., & Lotvall, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, **9**(6), 654–659.
- Vomhof-DeKrey & Picklo, 2012.** Vomhof-DeKrey, E. E., & Picklo, M. J. 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity reduces hypertrophy in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **53**(4), 690–700.
- Wadsworth, 2015.** Wadsworth, P. 2015. TPX2. *Curr. Biol.*, **25**(24), R1156–1158.
- Wang et al. , 2013.** Wang, W. J., Tay, H. G., Soni, R., Perumal, G. S., Goll, M. G., Macaluso, F. P., Asara, J. M., Amack, J. D., & Tsou, M. F. 2013. CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. *Nat. Cell Biol.*, **15**(6), 591–601.
- Wolter et al. , 2012.** Wolter, P., Schmitt, K., Fackler, M., Kremling, H., Probst, L., Hauser, S., Gruss, O. J., & Gaubatz, S. 2012. GAS2L3, a target gene of the DREAM complex, is required for proper cytokinesis and genomic stability. *J. Cell. Sci.*, **125**(Pt 10), 2393–2406.
- Woolner et al. , 2008.** Woolner, S., O'Brien, L. L., Wiese, C., & Bement, W. M. 2008. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.*, **182**(1), 77–88.
- Wu et al. , 2017.** Wu, J., Bao, L., Zhang, Z., & Yi, X. 2017. Nrf2 induces cisplatin resistance via suppressing the iron export related gene SLC40A1 in ovarian cancer cells. *Oncotarget*, **8**(55), 93502–93515.
- Xu et al. , 2016.** Xu, J., Tang, Y., Bei, Y., Ding, S., Che, L., Yao, J., Wang, H., Lv, D., & Xiao, J. 2016. miR-19b attenuates H₂O₂-induced apoptosis in rat H9C2 cardiomyocytes via targeting PTEN. *Oncotarget*, **7**(10), 10870–10878.
- Xu et al. , 2012.** Xu, X. L., Ma, W., Zhu, Y. B., Wang, C., Wang, B. Y., An, N., An, L., Liu, Y., Wu, Z. H., & Tian, J. H. 2012. The microtubule-associated protein ASPM regulates spindle assembly and meiotic progression in mouse oocytes. *PLoS ONE*, **7**(11), e49303.
- Xue et al. , 2013.** Xue, F., Li, H., Zhang, J., Lu, J., Xia, Y., & Xia, Q. 2013. miR-31 regulates interleukin 2 and kinase suppressor of ras 2 during T cell activation. *Genes Immun.*, **14**(2), 127–131.
- Xue et al. , 2014.** Xue, X., Cao, A. T., Cao, X., Yao, S., Carlsen, E. D., Soong, L., Liu, C. G., Liu, X., Liu, Z., Duck, L. W., Elson, C. O., & Cong, Y. 2014. Downregulation of microRNA-107 in intestinal CD11c(+) myeloid cells in response to microbiota and proinflammatory cytokines increases IL-23p19 expression. *Eur. J. Immunol.*, **44**(3), 673–682.

- Yamamoto et al. , 2017.** Yamamoto, R., Obbineni, J. M., Alford, L. M., Ide, T., Owa, M., Hwang, J., Kon, T., Inaba, K., James, N., King, S. M., Ishikawa, T., Sale, W. S., & Dutcher, S. K. 2017. *Chlamydomonas* DYX1C1/PF23 is essential for axonemal assembly and proper morphology of inner dynein arms. *PLoS Genet.*, **13**(9), e1006996.
- Yang et al. , 2015.** Yang, H., Li, T. W., Zhou, Y., Peng, H., Liu, T., Zandi, E., Martinez-Chantar, M. L., Mato, J. M., & Lu, S. C. 2015. Activation of a novel c-Myc-miR27-prohibitin 1 circuitry in cholestatic liver injury inhibits glutathione synthesis in mice. *Antioxid. Redox Signal.*, **22**(3), 259–274.
- Yang et al. , 2011.** Yang, M., Yao, Y., Eades, G., Zhang, Y., & Zhou, Q. 2011. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res. Treat.*, **129**(3), 983–991.
- Yasunaga et al. , 2015.** Yasunaga, T., Hoff, S., Schell, C., Helmstadter, M., Kretz, O., Kuechlin, S., Yakulov, T. A., Engel, C., Muller, B., Bensch, R., Ronneberger, O., Huber, T. B., Lienkamp, S. S., & Walz, G. 2015. The polarity protein Inturned links NPHP4 to Daam1 to control the subapical actin network in multiciliated cells. *J. Cell Biol.*, **211**(5), 963–973.
- Young et al. , 2000.** Young, T. F., Thacker, E. L., Erickson, B. Z., & Ross, R. F. 2000. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet. Microbiol.*, **71**(3-4), 269–279.
- Zhao et al. , 2008.** Zhao, Y., Coloff, J. L., Ferguson, E. C., Jacobs, S. R., Cui, K., & Rathmell, J. C. 2008. Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J. Biol. Chem.*, **283**(52), 36344–36353.
- Zheng et al. , 2015.** Zheng, L., Leung, E., Lee, N., Lui, G., To, K. F., Chan, R. C., & Ip, M. 2015. Differential MicroRNA Expression in Human Macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* Infection of Beijing/W and Non-Beijing/W Strain Types. *PLoS ONE*, **10**(6), e0126018.
- Zhou et al. , 2012.** Zhou, J., Yang, F., Leu, N. A., & Wang, P. J. 2012. MNS1 is essential for spermiogenesis and motile ciliary functions in mice. *PLoS Genet.*, **8**(3), e1002516.
- Zhou et al. , 2015.** Zhou, X., Xia, Y., Li, L., & Zhang, G. 2015. MiR-101 inhibits cell growth and tumorigenesis of *Helicobacter pylori* related gastric cancer by repression of SOCS2. *Cancer Biol. Ther.*, **16**(1), 160–169.

Acknowledgements (not compulsory)

Acknowledgements should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged.

Author contributions statement

SGM, MGF, AZ, and MFS conceived the experiments. SGM and MGF conducted the experiments with help from SR and FT. CM, ADGB, MGF, SGM, and LG analysed the sequencing data. SGM, MGF, AZ, and MFS wrote the manuscript with inputs from all other authors. All authors reviewed the manuscript.

Additional information

Data Accessibility: Accession Number for mRNA sequencing raw data: XXXXX; Accession Number for sRNA sequencing raw data: XXXXX. **Competing financial interests:** The authors declare that they have no competing interests.

The corresponding author is responsible for submitting a [competing financial interests statement](#) on behalf of all authors of the paper. This statement must be included in the submitted article file.

Supplementary Material

Supplementary Figures

Figure S1. Distribution of intracellular sRNAs sizes and types.

Figure S2. RT-qPCR of selected DE genes.

Figure S3. Production of hydrogen peroxide by different *M. hyopneumoniae* strains.

Supplementary Tables

Table S1. Trimming and mapping information of mRNA reads.

Table S2. Trimming and mapping information of miRNA reads.

Table S3. mRNA Read Counts Information.

Table S4. Complete DE Gene List (p-value > 0.05).

Table S5. ARE motifs in NRF2 putative regulated genes.

Table S6. mRNA Complete GO Enrichment Analysis.

Table S7. Novel Putative miRNAs of *Sus scrofa*.

Table S8. miRNA Read Counts Information.

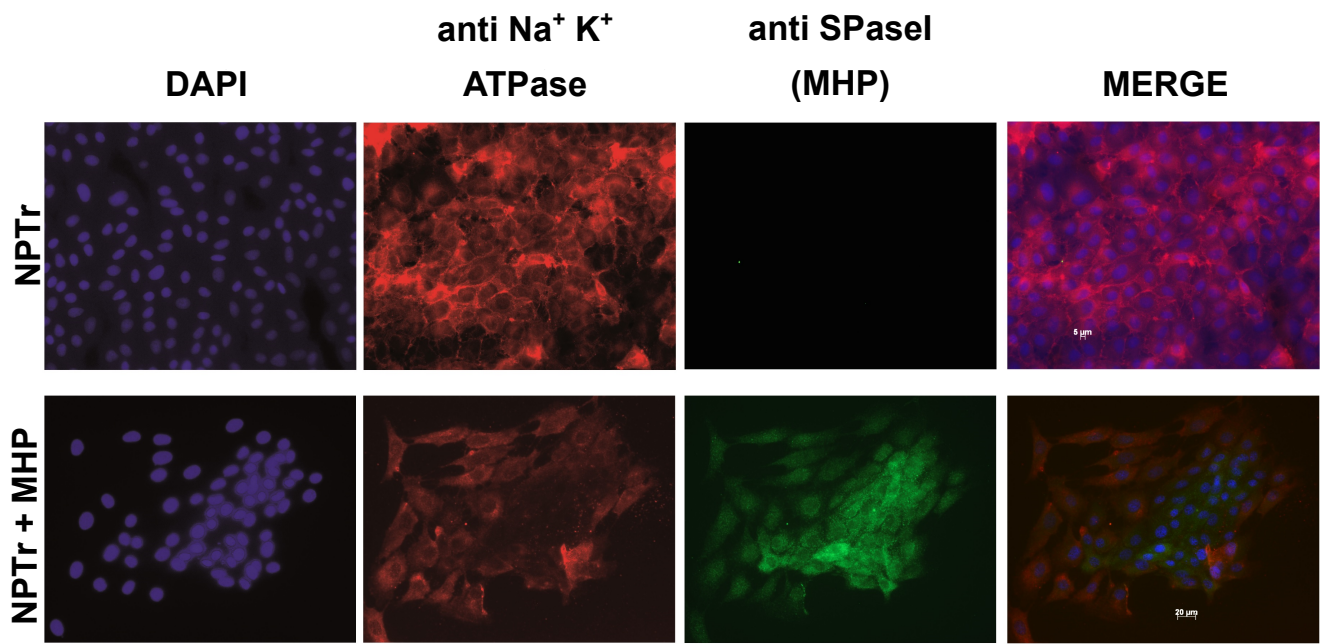
Table S9. Complete DE miRNA List (p > 0.05).

Table S10. sRNAs from *M. hyopneumoniae* detected in extracellular samples S7 and S8.

Table S11. Permissive and repressive target pairs between miRNAs and mRNAs.

Table S12. Complete GO Enrichment Analysis of DE miRNA targets.

Table S13. Primers for RT-qPCR of selected DE genes.



40x

Figure 1. Analysis of *M. hyopneumoniae* adherence to swine epithelial cells. Results of the immunofluorescence indicating adherence of *M. hyopneumoniae* to the membrane of the swine cells. Eukaryotic cell membranes were labeled with mouse anti-Sodium/Potassium ATPase alpha (red), *M. hyopneumoniae* was detected with rabbit anti-SPaseI (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). *M. hyopneumoniae* was detected co-localized with the membrane of swine cells.

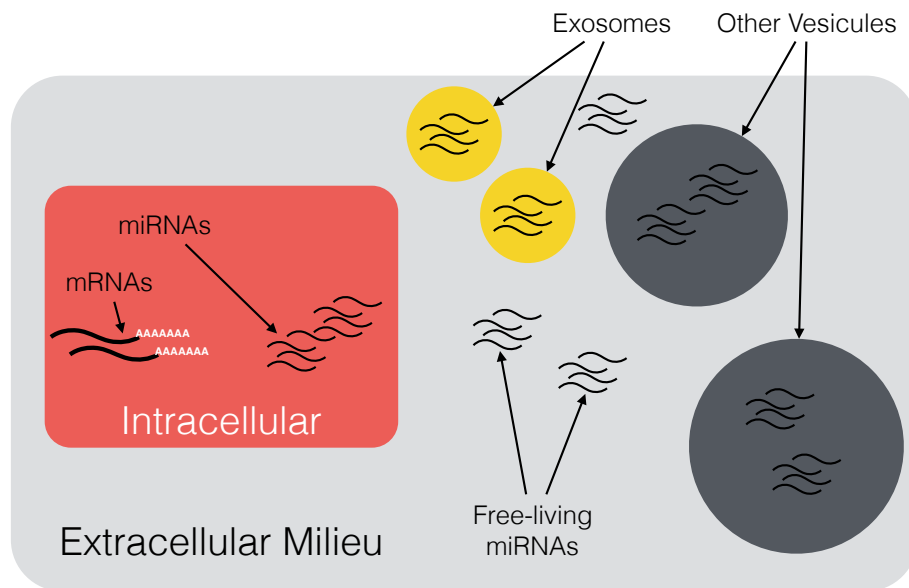


Figure 2. Experimental design of samples. Eukaryotic cells express mRNAs and miRNAs and also export some of these molecules to the extracellular environment in vesicles or in free form. Therefore, besides analyzing differential expression of intracellular mRNA samples (mRNA), we also analyzed DE miRNAs in distinct cell compartments. In this way, we extracted sRNAs from: i) cells (intra); ii) from the medium of cultured cells, which contained all kinds of vesicles released by the cells (microvesicles, exosomes, apoptotic bodies, etc) as well as free-living sRNAs (extra); iii) from exosomes released by cells (exo); iv) and from the supernatant of the ultracentrifugation of exosomes, which contained free-living miRNAs (SN). sRNAs of all these sources were sequenced and the differential expression between infected and non infected samples was analyzed.

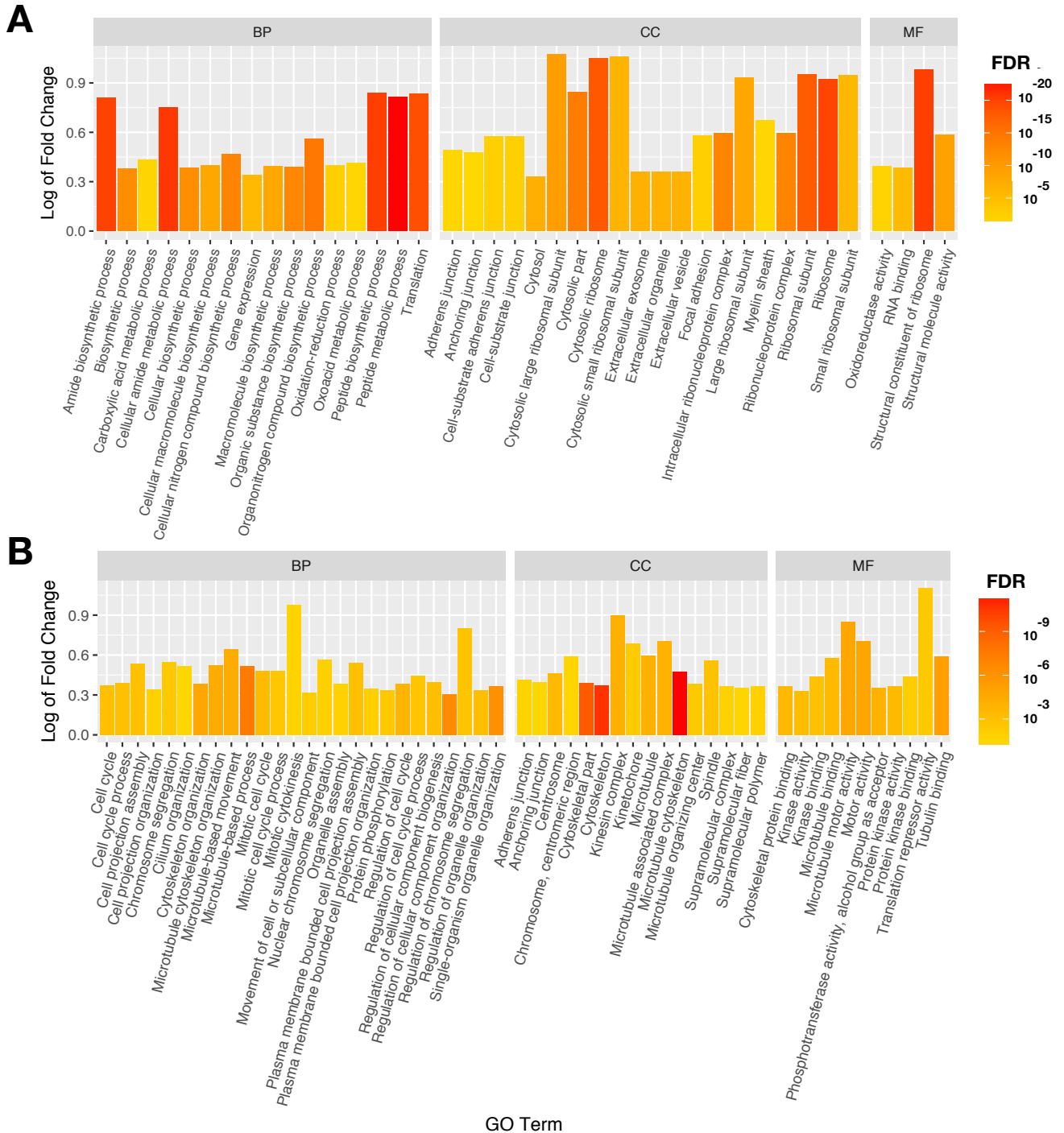


Figure 3. Significantly enriched Gene Ontology functions of DE mRNAs. A. Up-regulated cells were enriched in terms related to protein synthesis, oxidation-reduction activity and cell-cell communication (such as exosomes, anchoring and focal adhesion), either in biological process (BP), molecular function (MF) or cellular component (CP). B. down-regulated genes showed an enrichment of terms related to cytoskeleton, cell cycle and cell division in all the three categories.

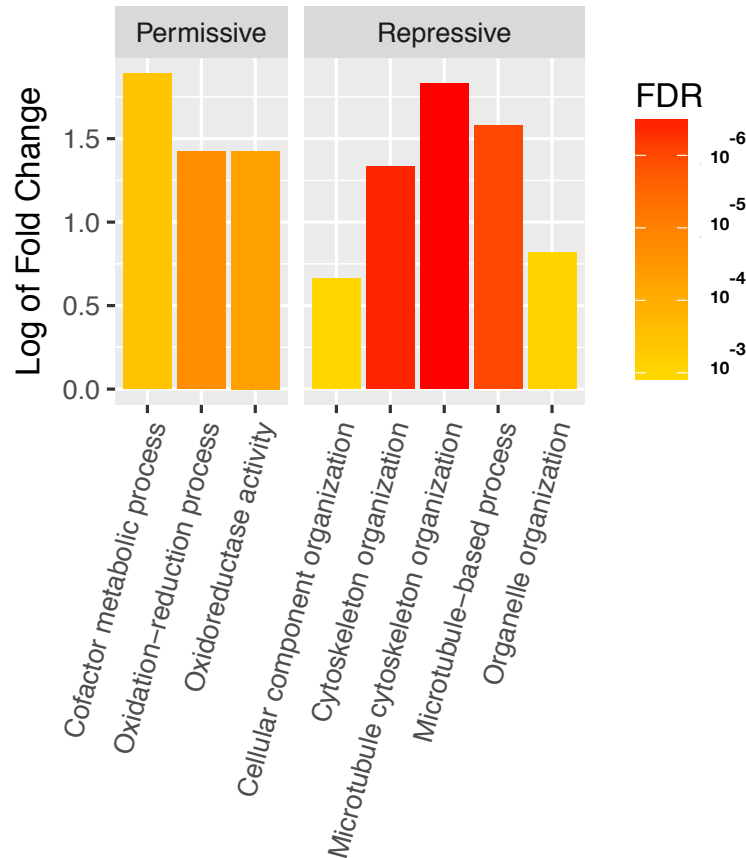
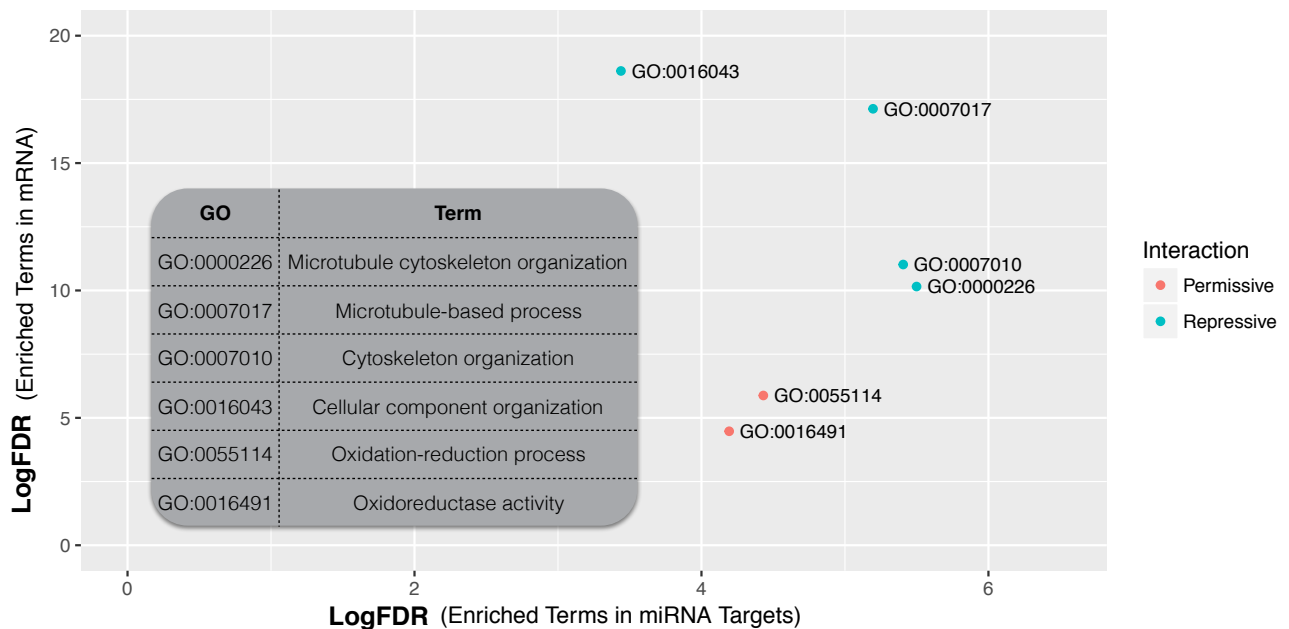
A**B**

Figure 4. Gene Ontology analyses of DE miRNA targets. A. DE miRNA targets of permissive interactions were enriched in terms related to oxidation-reduction process, while targets of repressive interactions were enriched in terms related to cytoskeleton. B. We found a correlation of some GO terms from DE mRNAs and targets of DE miRNAs, indicating that they are possibly involved in related functions. Up-regulated genes as well as targets of permissive interactions were enriched in oxidation-reduction related terms, while down-regulated genes and targets of repressive interactions were related to cytoskeleton functions.

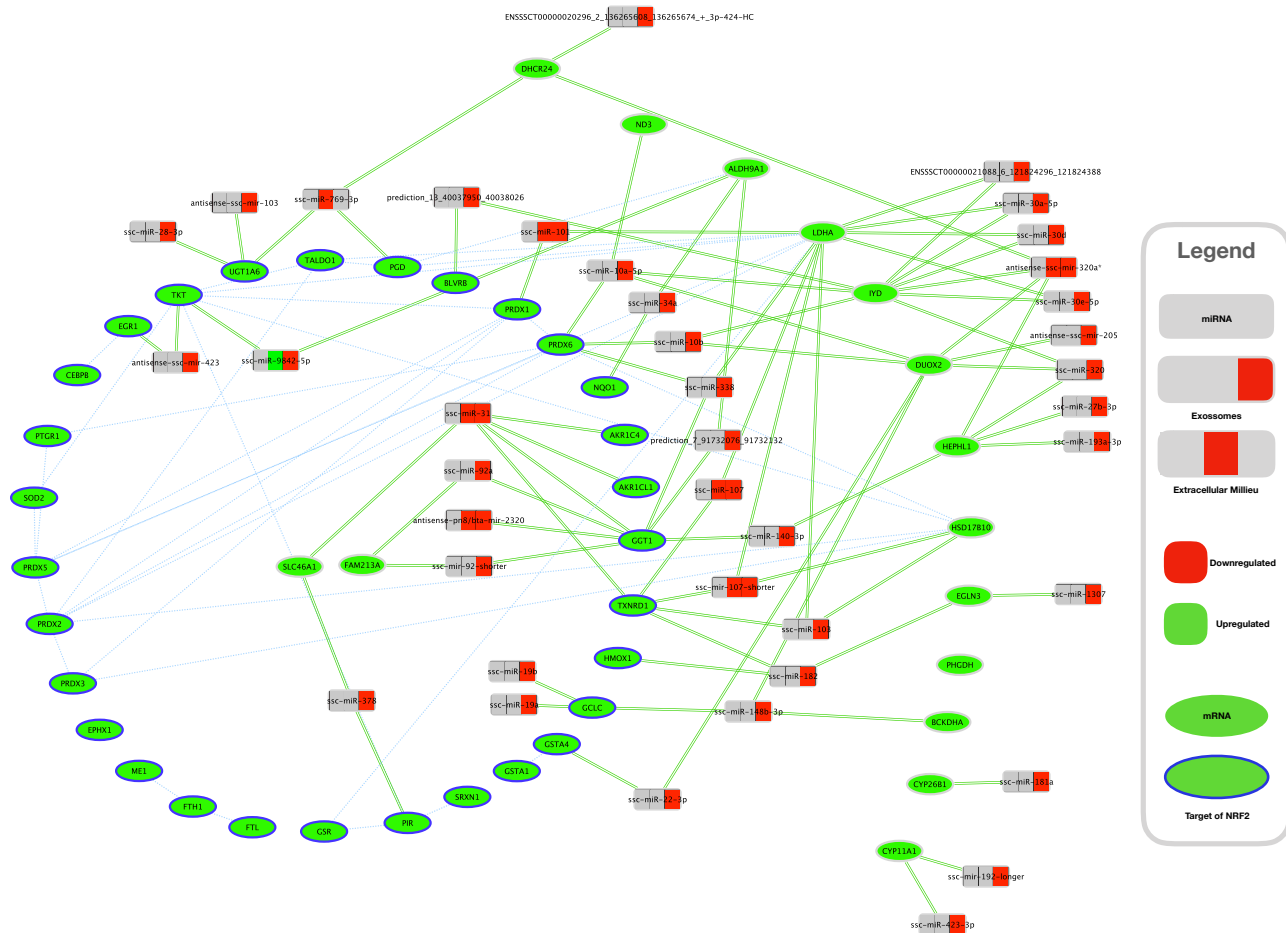


Figure 5. Interaction network of DE miRNA and genes involved in redox homeostasis. Down-regulated miRNAs (gray/red rectangles) that were predicted to target up-regulated genes (green ellipses) related to antioxidant and redox homeostasis function are shown. Green arcs represent permissive interactions between DE genes and miRNAs. The great majority of miRNAs targeting these genes are DE only in exosomes (rectangles partially colored in red, far right). Genes that were described in other organisms to be activated by NRF2 are marked with a blue border and interactions extracted from BioGrid are seen as pale blue arcs. These represent both physical and genetic interactions between either genes or proteins derived from such genes.

Sample ID	Name	RNA Type	Compartment		Condition	Replicates
mRNA S1-S3	mRNA CTRL	mRNA	Intracellular		Control	3
mRNA S4-S6	mRNA INF				Infected with MHP	3
sRNA-S1	EXO CTRL	sRNA	Extracellular	Exosomal miRNA	Control	Pool (50 biological replicates)
sRNA-S2	EXO INF				Infected with MHP	Pool (50 biological replicates)
sRNA-S3	SN CTRL			miRNA from vesicle-free supernatant	Control	Pool (50 biological replicates)
sRNA-S4	SN INF				Infected with MHP	Pool (50 biological replicates)
sRNA S5-S6	EXTRA CTRL			Total extracellular miRNA	Control	2
sRNA S7-S8	EXTRA INF				Infected with MHP	2
sRNA S9-S11	INTRA CTRL		Intracellular		Control	3
sRNA S12-S14	INTRA INF				Infected with MHP	3

Table 1. Samples detailed information

GeneID	Associated Gene Name	DE Genes Description	DESeq2		EdgeR		UP/DOWN	RT-qPCR Testing	qPCR in accordance with sequencing
			LogFC	padj	LogFC	FDR			
ENSSSCG00000028871	LOC396866	Cystatin-A1	0.691	4,35E-24 *	5.375	1.02E-14	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000030385	C3	Complement C3	1.427	4.69E-63	2.698	2.60E-43	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG00000021728	LGALS2	Galectin 2	0.646	5,38E-15 *	1.507	3.71E-05	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000028525	SAA3	Serum Amyloid A3	0.841	4.67E-25	1.211	2.88E-21	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG00000001101	SCGN	Secretagogin, EF-Hand Calcium Binding Protein	0.554	6.74E-09	1.018	9.06E-05	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000028982	AKR1C4	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C4	0.869	2.61E-76	0.953	4.61E-54	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000025277	AKR1CL1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C-Like 1	0.866	3.96E-76	0.949	5.46E-54	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG0000004678	DUOX2	Dual Oxidase 2	0.515	1.99E-09	0.721	6.93E-09	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000010146	LGALS8	Galectin 8	0.453	1.41E-06	0.691	2.39E-15	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG00000025273	CYP11A1	Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1	0.510	1.39E-11	0.648	3.80E-11	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000003402	PGD	Phosphogluconate Dehydrogenase	0.611	3.62E-61	0.647	2.71E-36	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG00000008959	CXCL2	C-X-C Motif Chemokine Ligand 2	0.491	5.15E-13	0.590	1.10E-11	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000007435	PLTP	Phospholipid Transfer Protein	0.436	7.49E-09	0.544	3.54E-08	Upregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000010853	EPHX1	Epoxide Hydrolase 1	0.444	5.20E-15	0.503	1.76E-06	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000000843	TXNRD1	Thioredoxin Reductase 1	0.426	7.45E-14	0.482	7.33E-13	Upregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000017135	ZNF750	Zinc Finger Protein 750	-0.741	7,84E-26 *	-4.899	3.43E-15	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000009399	CYSLTR2	Cysteinyl Leukotriene Receptor 2	-0.439	1,01E-07 *	-1.034	2.57E-02	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000013401	DKK3	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3	-0.581	5.15E-13	-0.774	1.35E-12	Downregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG00000016273	HTR2B	5-Hydroxytryptamine Receptor 2B	-0.434	1.37E-05	-0.735	2.12E-03	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000014232	LOX	Lysyl Oxidase	-0.464	1.06E-06	-0.718	1.39E-04	Downregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000011217	NEK10	NIMA Related Kinase 10	-0.418	2.80E-05	-0.689	4.20E-03	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000003810	UBE2U	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 U (Putative)	-0.392	1.38E-04	-0.676	8.30E-03	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000011441	TNNC1	Troponin C1, Slow Skeletal And Cardiac Type	-0.399	5.92E-05	-0.633	3.27E-03	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000015413	FGL2	Fibrinogen Like 2	-0.487	1.81E-15	-0.554	1.64E-14	Downregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ENSSSCG00000008334	MXD1	MAX Dimerization Protein 1	-0.385	3.21E-06	-0.486	3.02E-05	Downregulated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000027157	SLC40A1	Solute Carrier Family 40 Member 1	-0.351	1.51E-04	-0.478	1.82E-03	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000006072	VPS13B	Vacuolar Protein Sorting 13 Homolog B	-0.359	4.30E-05	-0.469	5.52E-04	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000028322	BTG2	BTG Anti-Proliferation Factor 2	-0.394	2.61E-09	-0.452	2.29E-04	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000016059	STAT4	Signal Transducer And Activator Of Transcription 4	-0.354	6.36E-06	-0.430	6.75E-05	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ENSSSCG00000028196	MFF	Mitochondrial Fission Factor	-0.352	6.40E-06	-0.427	3.85E-05	Downregulated	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

*: In the cases where EdgeR detected a DE gene with high significance and the padj was not calculated in DESeq2 due to the presence of one outlier, we checked case by case and validated as DE, whenever suitable. The P-value showed in these cases is the value calculated prior to multitesting for demonstration purposes only.

Table 2. Selected up- and down-regulated DE genes. Information about the top 15 up- and 15 down-regulated DE genes from both DeSeq2 and EdgeR methods. Eight up-regulated and four down-regulated genes were selected for experimental validation by RT-qPCR. Of these, five up-regulated and two down-regulated genes were in accordance with the expression of sequencing data.

DE Genes			DESeq2		EdgeR		Reference ¹
GeneID	Associated Gene Name	Description	LogFC	padj	LogFC	FDR	
ENSSSCG00000028982	AKR1C4	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C4	0.869	2.61E-76	0.953	4.61E-54	Hayes & McMahon, 2009.
ENSSSCG00000025277	AKR1CL1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C-Like 1	0.866	3.96E-76	0.945	3.94E-20	Hayes & McMahon, 2009.
ENSSSCG00000003402	PGD	Phosphogluconate Dehydrogenase	0.611	3.62E-61	0.643	1.57E-10	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000025273	CYP11A1*	Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1	0.510	1.39E-11	0.648	3.80E-11	
ENSSSCG00000010853	EPHX1	Epoxide Hydrolase 1	0.444	5.20E-15	0.498	3.80E-07	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000014540	FTH1	Ferritin Heavy Chain 1	0.436	1.81E-24	0.465	3.64E-14	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000003153	FTL	Ferritin Light Chain	0.427	1.25E-24	0.455	4.52E-04	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000000843	TXNRD1	Thioredoxin Reductase 1	0.426	7.45E-14	0.478	2.24E-13	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000002754	NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1	0.415	7.89E-18	0.451	3.26E-04	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000002626	GSTA1*	Glutathione S-Transferase A1	0.407	1.02E-12	0.456	1.44E-03	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000016312	UGT1A6*	UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A6	0.367	1.88E-18	0.390	3.60E-04	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000011147	AKR1C1	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C1	0.360	1.28E-04	0.507	2.70E-03	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000021386	PTGR1	Prostaglandin Reductase 1	0.358	6.02E-12	0.392	5.66E-05	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000001488	GCLC	Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit	0.350	2.78E-10	0.388	6.30E-10	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000002825	CES1*	Carboxylesterase 1	0.348	5.58E-12	0.379	1.53E-02	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000012136	PIR	Pirin	0.334	9.34E-07	0.388	1.80E-06	Brzóska et al., 2014.
ENSSSCG00000025762	GSR*	Glutathione S-Reductase	0.314	2.46E-03	0.485	6.49E-02	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000029144	SRXN1*	Sulfiredoxin 1	0.309	3.31E-06	0.355	1.93E-05	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000010055	GGT5	Gamma-Glutamyltransferase 5	0.305	1.38E-03	0.421	3.33E-03	
ENSSSCG00000014833	UCP2	Uncoupling Protein 2	0.303	5.10E-03	0.509	4.52E-02	
ENSSSCG00000028099	SLC6A6*	Solute Carrier Family 6 Member 6	0.295	2.36E-03	0.408	1.00E-02	Hayes & McMahon, 2009.
ENSSSCG00000026759	HMOX1	Heme Oxygenase 1	0.272	9.35E-03	0.397	1.15E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000008311	CYP26B1	Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1	0.267	4.82E-03	0.359	8.22E-03	
ENSSSCG00000028996	ALDH1A1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1	0.261	1.47E-18	0.270	2.16E-09	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000006717	PHGDH	Phosphoglycerate Dehydrogenase	0.260	1.20E-07	0.285	4.62E-05	
ENSSSCG00000021067	BLVRB	Biliverdin Reductase B	0.259	2.00E-04	0.298	7.14E-04	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000013366	LDHA	Lactate Dehydrogenase A	0.255	9.07E-07	0.281	8.19E-05	
ENSSSCG00000029781	SELENOM	Selenoprotein M	0.254	2.25E-02	0.406	5.78E-02	
ENSSSCG00000001723	PLA2G7	Phospholipase A2 Group VII	0.250	4.58E-04	0.289	1.43E-03	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000004093	IYD	Iodotyrosine Deiodinase	0.250	1.09E-02	0.339	1.83E-02	
ENSSSCG00000001963	EGLN3	Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3	0.248	7.36E-03	0.324	9.69E-03	
ENSSSCG00000003914	PRDX1	Peroxiredoxin 1	0.231	1.02E-07	0.244	1.70E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000017092	GPX3	Glutathione Peroxidase 3	0.224	7.69E-05	0.246	1.66E-01	Kensler et al., 2007.
ENSSSCG00000018048	SLC5A10	Solute Carrier Family 5 Member 10	0.215	3.21E-03	0.247	1.29E-02	Hayes & McMahon, 2009.
ENSSSCG00000003491	AKR7A2	Aldo-Keto Reductase Family 7 Member A2	0.205	1.69E-02	0.247	5.33E-02	Li et al., 2015.
ENSSSCG00000021408	TKT	Transketolase	0.190	2.39E-06	0.200	3.27E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000010340	FAM213A	Family With Sequence Similarity 213 Member A	0.184	1.62E-05	0.198	4.20E-03	
ENSSSCG00000010056	GGT1	Gamma-Glutamyltransferase 1	0.178	1.95E-02	0.205	2.08E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000013030	PRDX5	Peroxiredoxin 5	0.177	1.04E-02	0.199	3.62E-02	Graham et al., 2018.
ENSSSCG00000012847	TALDO1	Transaldolase 1	0.177	3.29E-03	0.194	2.99E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000030461	HEPFL1	Hephaestin Like 1	NA	NA	3.003	3.60E-04	
ENSSSCG00000018084	ND3	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 3	0.166	2.19E-03	0.183	2.77E-02	
ENSSSCG00000012327	HSD17B10	Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 10	0.164	1.66E-02	0.188	1.94E-02	
ENSSSCG00000003007	BCKDHA	Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase E1, Alpha Polypeptide	0.163	3.52E-02	0.191	5.54E-02	
ENSSSCG00000010928	KDM5B	Lysine Demethylase 5B	0.161	2.36E-04	0.174	1.58E-02	
ENSSSCG00000014336	EGR1	Early Growth Response 1	0.159	2.52E-04	0.168	3.80E-07	Gomez et al., 2016.
ENSSSCG00000008550	SLC5A6	Solute Carrier Family 5 Member 6	0.155	2.36E-03	0.165	3.23E-01	Hayes & McMahon, 2009.
ENSSSCG00000006324	ALDH9A1	Aldehyde Dehydrogenase 9 Family Member A1	0.155	6.71E-04	0.168	2.07E-02	
ENSSSCG00000022742	PRDX6	Peroxiredoxin 6	0.151	1.49E-03	0.160	2.22E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000001701	HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	0.149	2.11E-04	0.156	6.31E-09	Hayes & McMahon, 2009.
ENSSSCG00000028739	CEBPB	CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta	0.148	1.32E-02	0.161	5.27E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000004454	ME1	Malic Enzyme 1	0.145	5.30E-03	0.155	5.39E-01	Hayes & Dinkova-Kostova, 2014.
ENSSSCG00000010682	PRDX3	Peroxiredoxin 3	0.139	1.35E-02	0.149	4.36E-01	Gomez et al., 2016.
ENSSSCG00000027525	DHCR24	24-Dehydrocholesterol Reductase	0.123	3.68E-03	0.133	5.52E-02	
ENSSSCG00000029876	SOD2	Superoxide Dismutase 2	0.112	1.66E-02	0.119	7.17E-01	Reszka et al., 2013.

¹ References related to genes regulated by NRF2. *Genes with more than one ID identified as DE.

Table 3. DE Genes involved in redox homeostasis Detailed information for differential expression of genes (from both DeSeq2 and EdgeR methods) related to antioxidant and redox homeostasis functions. The great majority of such genes is putatively activated by NRF2 transcription factor in other species.

miRNA ID	DB Type	Intracellular		Extracellular		Exosomes		GFOLD	Play a role in other bacterial infection
		DE	LogFC	DE	LogFC	DE	LogFC		
13-dna-10	novel	Upregulated	4.121 *1	Upregulated	9.42	Upregulated	3.65857		
4-dna-57	novel	Upregulated	1.218	Upregulated	12.164	Upregulated	11.5821		
9-dna-16	novel	Upregulated	0.788	Upregulated	13.079	Upregulated	7.94656		
9-dna-26	novel	Upregulated	1.448	Upregulated	11.27	Upregulated	3.5923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [Dai et al., 2015] *2	
mmu-mir-2143-2_6_251367_251451_3p_5-424-HC	Martini et al., 2014	Upregulated	2.053 *1	Upregulated	5.899	Upregulated	2.18707		
ssc-miR-1285	mirBase	NA	NA	Upregulated	4.965	NA	NA	<i>Chlamydia trachomatis</i> [Derrick et al., 2013; Derrick et al., 2016]	
ssc-miR-196b-5p	mirBase	NA	NA	Upregulated	3.971	NA	-1.20692	<i>Mycobacterium avium</i> [Liang et al., 2016]	
ssc-miR-212	mirBase	NA	NA	Upregulated	8.723	NA	1.00576	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [Siddle et al., 2015]	
ssc-miR-24-1-5p	mirBase	NA	NA	Upregulated	9.742	NA	NA	<i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> [Naqvi et al., 2015]	
ssc-miR-146a-5p	mirBase	Upregulated	1.015	NA	NA	NA	NA	<i>Helicobacter pylori</i> [Liu et al., 2010; Li et al., 2012; Liu et al., 2013]; LPS stimulation [Cheng et al., 2012]	
ssc-miR-9842-5p	mirBase	NA	NA	Upregulated	4.484	Downregulated	-2.49742		
ssc-miR-184	mirBase	Downregulated	-0.594	NA	NA	NA	NA	<i>Chlamydia trachomatis</i> [Derrick et al., 2017]	
ssc-miR-140-3p	mirBase	NA	NA	NA	NA	Downregulated	-3.53554	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [Zheng et al., 2015]	
ssc-miR-769-3p	mirBase	NA	NA	Downregulated	-3.924 *1	NA	NA		
ssc-miR-101	mirBase	NA	NA	Downregulated	NA	Downregulated	-2.98607	<i>Helicobacter pylori</i> [Matsushima et al., 2010]	
ssc-miR-107	mirBase	NA	NA	Downregulated	NA	Downregulated	-2.0518	Gut microbiota [Xue et al., 2014]	
ssc-miR-31	mirBase	NA	NA	Downregulated	NA	Downregulated	-2.00434	<i>Helicobacter pylori</i> [Matsushima et al., 2010]; T-cell activation [Xue et al., 2013]	
ssc-miR-532-5p	mirBase	NA	NA	Downregulated	NA	Downregulated	-3.91604	LPS stimulation [Cheng et al., 2012]	
antisense-p18/hta-mir-2920_6_43856629_43866722_ NA-424-HC	Martini et al., 2014	NA	NA	Downregulated	-3.343	Downregulated	-4.44013	<i>Acinetobacter pleuropneumoniae</i> *3 [Podolska et al., 2012]	
antisense-ssc-mir-320a*14_6473893_6473973_ NA,antisense-ssc-mir-320a*14_6473894_6473960_ NA-424-HC	Martini et al., 2014	NA	NA	Downregulated	NA	Downregulated	-2.93279	<i>Helicobacter pylori</i> [Noto et al., 2013]	
ssc-mir-107-shorter/isc-isomir-107_14_106321702_106321768_ NA-424-HC	Martini et al., 2014	NA	NA	Downregulated	NA	Downregulated	-2.20638	Gut microbiota [Xue et al., 2014]	

*1: Whenever LogFC from DESeq2 was not validated, we provide LogFC from EdgeR;

*2: Reference related to cel-miR-233-5p, a possible homolog of novel miRNA 9-dna-26;

*3: *A. pleuropneumoniae* was also related to a swine cell infection.

Table 4. Selected DE miRNAs. Information about selected up- and down-regulated miRNAs in intracellular, extracellular and exosome samples. Several homologues of these miRNAs were already described to be involved with bacterial infection in other species and references are provided whenever we found a correlation in the same sense of expression as in this work. The only miRNA that showed ambiguous expression among conditions was ssc-miR-9842-5p, which had inverse expression between extracellular (up-regulated) and exosome (down-regulated) samples.

Upregulated GeneID	Downregulated miRNA ID	miRNA Expression		
		Intracellular	Extracellular	Exosome
AKR1C4	ssc-miR-31	NA	Downregulated	Downregulated
AKR1CL1	ssc-miR-31	NA	Downregulated	Downregulated
BLVRB	prediction_13_40037950_40038026_-_3p-353-MC	NA	NA	Downregulated
EGR1	antisense-ssc-mir-423_12_44150500_44150579_-_NA-353-MC	NA	NA	Downregulated
GCLC	ssc-miR-148b-3p	NA	NA	Downregulated
GCLC	ssc-miR-19a	NA	NA	Downregulated
GCLC	ssc-miR-19b	NA	NA	Downregulated
GGT1	ssc-miR-338	NA	NA	Downregulated
GGT1	ssc-miR-140-3p	NA	NA	Downregulated
GGT1	ssc-mir-92-shorter/ssc-isomir-92_X_108178486_108178565_-_NA;ssc-mir-92-shorter/ssc-isomir-92_X_108212408_108212487_-_NA-424-HC	NA	NA	Downregulated
GGT1	ssc-miR-92a	NA	NA	Downregulated
GGT1	prediction_7_91732076_91732132+_5p-353-MC	NA	NA	Downregulated
GGT1	ssc-miR-31	NA	Downregulated	Downregulated
GGT1	antisense-pn8/bta-mir-2320_6_43886629_43886722_-_NA-424-HC	NA	Downregulated	Downregulated
HMOX1	ssc-miR-182	NA	NA	Downregulated
HSP90AB1	ssc-miR-101	NA	Downregulated	Downregulated
NQO1	ssc-miR-34a	NA	NA	Downregulated
PGD	ssc-miR-769-3p	NA	Downregulated	NA
PIR	ssc-miR-378	NA	NA	Downregulated
PRDX1	ssc-miR-101	NA	Downregulated	Downregulated
PRDX6	ssc-miR-10a-5p	NA	NA	Downregulated
PRDX6	ssc-miR-10b	NA	NA	Downregulated
PRDX6	ssc-miR-338	NA	NA	Downregulated
SLC5A10	ssc-miR-1307	NA	NA	Downregulated
SLC5A10	antisense-pn8/bta-mir-2320_6_43886629_43886722_-_NA-424-HC	NA	Downregulated	Downregulated
SLC5A6	ssc-miR-10b	NA	NA	Downregulated
SLC5A6	ssc-miR-338	NA	NA	Downregulated
SLC5A6	ssc-miR-423-3p	NA	NA	Downregulated
SLC5A6	ssc-miR-27b-3p	NA	NA	Downregulated
SLC5A6	prediction_7_91732076_91732132+_5p-353-MC	NA	NA	Downregulated
SLC6A6	ssc-miR-340	NA	NA	Downregulated
TKT	antisense-ssc-mir-423_12_44150500_44150579_-_NA-353-MC	NA	NA	Downregulated
TXNRD1	ssc-miR-103	NA	NA	Downregulated
TXNRD1	ssc-miR-182	NA	NA	Downregulated
TXNRD1	ssc-mir-107-shorter/ssc-isomir-107_14_106321702_106321788_-_NA-424-HC	NA	Downregulated	Downregulated
TXNRD1	ssc-miR-107	NA	Downregulated	Downregulated
TXNRD1	ssc-miR-31	NA	Downregulated	Downregulated
UGT1A6	ssc-miR-28-3p	NA	NA	Downregulated
UGT1A6	antisense-ssc-mir-103_16_52667657_52667738+_NA-424-HC	NA	NA	Downregulated
UGT1A6	ssc-miR-769-3p	NA	Downregulated	NA

Table 5. DE Genes putatively activated by NRF2 that were predicted as targets of DE miRNAs.

4.3 – Capítulo 3: Avaliação do efeito de exossomos no cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Justificativa: É de conhecimento geral que os patógenos podem alterar a regulação gênica de seus hospedeiros, podendo manipular a fisiologia e as defesas do hospedeiro a seu favor (DUVAL *et al.*, 2016). No entanto, até recentemente não havia informações sobre o hospedeiro regulando a expressão gênica de seus patógenos. Em 2016, Liu e colaboradores demonstraram que hospedeiros humanos e murinos são capazes de alterar a microbiota intestinal através de miRNAs fecais. Além disso, foi demonstrado que miRNAs específicos do hospedeiro podem alterar o crescimento de bactérias presentes na microbiota intestinal e também regular alguns de seus genes (LIU *et al.*, 2016). Dessa forma, existe interesse de identificar se o hospedeiro suíno, em especial através de exossomos, é capaz de alterar a fisiologia de *M. hyopneumoniae*.

Objetivo: Avaliar o efeito de exossomos isolados da linhagem epitelial NPTr sobre *M. hyopneumoniae*.

4.3.1 – Materiais e métodos

4.3.1.1 – Cultivo celular e isolamento de exossomos

Células da linhagem epitelial NPTr (new-born pig trachea) (FERRARI *et al.*, 2002) foram cultivadas em meio MEM/EBSS com 2 mM de L-glutamina (GE Healthcare) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (FBS) (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (GE Healthcare). Os cultivos foram realizados a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera úmida em frascos de 75 cm². Sub-passagens foram feitas quando as células atingiam 80-100% de confluência. Para cada extração de exossomos foram utilizadas cerca de 30 garrafas de cultivo. Após atingirem a confluência, as células foram transfectadas com adenovírus-GFP não-replicativo por 24h a 30h. Após esse período, a transfecção foi confirmada por microscopia de fluorescência. O sobrenadante das células foi então removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS e as células foram incubadas com meio MEM/EBSS sem FBS e antibióticos (depletado de exossomos) por

48h. Após a incubação, o sobrenadante contendo as vesículas de interesse foi recuperado e as células foram adequadamente descartadas.

O isolamento de exossomos foi feito de acordo com Forterre *et al.* (2014). Inicialmente, o sobrenadante recuperado foi centrifugado por 20 min a 2.000 g e por 30 min a 10.000 g para eliminar debris celulares e organelas. O sobrenadante resultante dessas centrifugações foi filtrado com filtro de 0,22 µm para remover as partículas maiores. As vesículas exossomais foram precipitadas por ultracentrifugação a 100.000 g por 90 min a 4°C (ultracentrífuga Beckman-Coulter, Optima™ MAX-XP, rotor MLA-55). O sobrenadante foi descartado, e os exossomos precipitados foram lavados com 10 mL de PBS gelado, centrifugados a 100.000 g por 70 min a 4°C e ressuspensos em 50 µL de PBS. Os exossomos foram quantificados através da quantidade de proteínas presentes nas vesículas pelo método de Bradford. As vesículas foram conservadas a -80°C.

4.3.1.2 – Desenvolvimento de um meio definido para o cultivo de micoplasmas do trato respiratório suíno

Os métodos e resultados referentes a esse tópico fazem parte do artigo científico “Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling”, publicado na revista BMC Genomics em 2016, apresentado integralmente nos Anexos desta tese.

Resumidamente, para testar o crescimento de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis*, o meio definido desenvolvido para o cultivo de *M. pneumoniae* (YUS *et al.*, 2009) foi modificado e suplementado com todos os aminoácidos (Yus+), pois não havia informações sobre o metabolismo dessas espécies. Além deste, o meio comercial CMRL-1066 (Invitrogen) foi testado e suplementado com peptona e/ou com outros cofatores que não estavam presentes na fórmula (CMRL+/Pep e CMRL+). Os micoplasmas foram cultivados a 37°C por variados períodos de tempo sob agitação suave (100 rpm). As composições dos meios podem ser encontradas no Anexo 9.3 desta tese.

4.3.1.3 – Estimativa da concentração celular pelo método de *color changing units* (CCU)

O crescimento celular de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis* nos meios definidos foi estimado pelo método de CCU, como descrito por Stemke & Roberston (1990). Para a medida de concentração celular em diferentes tempos, as células foram submetidas a uma diluição seriada de 1:10 a 1:10²⁰. Por esse método, 1 CCU representa a maior diluição de uma suspensão bacteriana que pode causar a mudança de cor de vermelho para amarelo no meio de cultura, indicando a presença de células viáveis (PURCELL *et al.*, 1966).

Para analisar se a adição de exossomos ao meio de cultura afeta o crescimento dos micoplasmas, foram inoculados 10⁷ CCU de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis* (separadamente) em 2 mL de meio definido (Yus+). As bactérias foram mantidas a 37°C com agitação por 8h e em seguida foram separados dois grupos: grupo controle, no qual nada foi adicionado; e grupo Exo+, onde foram adicionados 5 µg de exossomos por mL de cultivo. A determinação de CCU foi realizada a partir dos cultivos coletados nos seguintes tempos: 0h (momento em que as bactérias foram inoculadas), 8h (momento em que as vesículas foram inoculadas), 24h, 32h, 48h, 56h e 72h. Todos os cultivos foram realizados em duplicata biológica e a quantificação das bactérias por CCU em placas de 96 poços foi realizada em triplicata técnica. As placas com as diluições seriadas foram mantidas em estufa a 37°C por 2 semanas e após esse período foram contados em quantos poços (diluições) ocorreu crescimento bacteriano.

4.3.1.4 – Estimativa da concentração celular por citometria de fluxo

O efeito da adição de exossomos no crescimento de *M. hyopneumoniae* também foi analisado por citometria de fluxo. Para isso, *M. hyopneumoniae* foi inoculado em 5 mL de meio definido (Yus+) e foram separados os mesmos grupos definidos anteriormente (controle e exo+). Porém, nesse experimento os exossomos foram inoculados no mesmo momento em que as bactérias. Foram realizadas leituras de contagem das células nos seguintes tempos: 0h, 2h, 6h, 9h, 12h, 24h e 48h.

Para a determinação do número de células, os micoplasmas foram sedimentados por centrifugação a 3360 g por 20 min a 4°C e lavados três vezes com NaCl 0,9% (1x 3360g por 20 min e 2x 3360 g por 4 min). As células foram ressuspensas em 500 µL de

NaCl 0,9% e diluídas 1:10 para leituras no citômetro Guava EasyCyte (Millipore). As células foram caracterizadas por *side-angle scatter* (SSC) e *forward-angle scatter* (FSC) numa escala logarítmica de quatro décadas. A contagem absoluta de células foi realizada até 5000 eventos e as amostras foram diluídas até que a concentração celular para contagem estivesse abaixo de 500 células/ μ L. Os resultados obtidos são mostrados na forma de células/ μ L.

4.3.1.5 – Extração de proteínas de *M. hyopneumoniae*

Para a extração de proteínas, *M. hyopneumoniae* foi cultivado na presença ou ausência de exossomos contendo a proteína GFP, provenientes de células NPTr transfectadas com adenovírus-GFP não-replicativo. *M. hyopneumoniae* foi inoculado em 5 mL de meio Friis e mantido a 37°C sob agitação suave. Após 24h de cultivo, foram adicionados os exossomos na concentração de 5 e 10 μ g/mL de cultivo nas amostras teste e nada na condição controle. Ao fim de 72h de cultivo, as células foram centrifugadas a 4000 g por 15 min e lavadas três vezes com 1 mL de PBS. Após a lise celular, as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e as proteínas foram quantificadas pelo método de BCA.

4.3.1.6 – Western blot

Para o *western blot*, inicialmente 10 μ g de proteínas nas amostras de *M. hyopneumoniae* e 4 μ g no controle positivo (exossomos contendo a proteína GFP purificados de células NPTr transfectadas com adenovírus-GFP) foram resolvidos em gel de poliacrilamida *anyKD* (BioRad). Após a separação das proteínas, estas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em um sistema *semi-dry* por 25 minutos com voltagem constante (25 V) em tampão Tris-glicina. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1h em tampão TBS (Tris-buffered saline) com 10% de soro de cavalo. Após o bloqueio, foi adicionado o anticorpo primário anti-GFP (Invitrogen) na diluição de 1:1000 no tampão de bloqueio e a membrana foi incubada por 2h. A membrana foi lavada por 3x de 3 min em tampão TBS-tween e 1x de 3 min em tampão TBS. O anticorpo secundário pig anti-rabbit conjugado à peroxidase (Dako) foi adicionado na diluição de 1:1000 em tampão de bloqueio e a membrana foi incubada novamente por 1h e 30 min.

Foram repetidas as lavagens da membrana e em seguida foi feita a revelação das proteínas com peroxidase e TMB (Invitrogen).

4.3.2 – Resultados e Discussão

4.3.2.1 – Desenvolvimento de um meio definido para o cultivo de micoplasmas do trato respiratório suíno

O desenvolvimento de um meio definido para o cultivo de micoplasmas do trato respiratório suíno, além do principal objetivo que foi estudar o metabolismo dessas espécies, também foi importante para o estudo da interação destas com exossomos. Isso porque o meio Friis, meio de cultivo padrão para *M. hyopneumoniae*, além de ser muito complexo, possui soro suíno, que contém exossomos. Desse modo, foram testados alguns meios de composição definida no cultivo de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis* e em seguida foi escolhido aquele que apresentava melhor resultado no cultivo das três espécies.

Os meios testados, como definido nos materiais e métodos, foram Yus+, CMRL+ e CMRL+/Pep e a concentração e viabilidade celular foi determinada por CCU. Este método foi escolhido, pois devido às características das bactérias, medidas de turbidimetria e ensaios colorimétricos não são possíveis de serem utilizados. Como resultado, foi observado que nenhum dos meios utilizados proporcionou o crescimento bacteriano. No meio CMRL suplementado, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* permaneceram viáveis apenas quando a peptona estava presente (CMRL+/Pep). No entanto, a peptona pareceu ter efeito negativo sobre o crescimento de *M. hyorhinis*, hipótese que ainda deve ser confirmada. O meio Yus+ não possibilitou o crescimento bacteriano, no entanto todas as espécies permaneceram viáveis mesmo após 5 dias de cultivo (se inoculadas posteriormente em meio complexo). A manutenção da viabilidade celular no meio Yus+ foi posteriormente confirmada por estimativa da concentração celular por citometria de fluxo (Tabela 2). Desse modo, o meio em que as três espécies analisadas parecem se comportar de forma mais similar foi o meio Yus+.

Tabela 2. Contagem de células de *M. hyopneumoniae* cultivadas em diferentes tempos nos meios Yus+ e Friis.

	0h	2h	5h	8h	24h
Yus+	365	374	383	351	437
Friis	965	1635	2818	3050	4706

Células/ μ L

4.3.2.2 – Análise da influência de exossomos no crescimento de micoplasmas

Inicialmente foi avaliado se a interação com exossomos provenientes da linhagem celular NPTr altera de alguma maneira o crescimento dos micoplasmas suínos. O meio de cultura escolhido para essa análise foi o meio Yus+, pois, como este mantém a viabilidade celular dos micoplasmas, qualquer mudança em relação ao crescimento bacteriano poderia ser mais facilmente percebida, tanto na ocorrência de multiplicação quanto de morte celular.

No primeiro momento, a técnica de CCU foi usada para avaliar o crescimento bacteriano em contato com os exossomos. Em todos os tempos analisados, os resultados mostraram que não houve diferença no número de CCU dos micoplasmas com a adição dos exossomos no meio de cultura. No entanto, como essa técnica apresenta baixa sensibilidade, mudanças pequenas de multiplicação celular não seriam percebidas e decidiu-se utilizar uma técnica mais sensível para estimar o crescimento bacteriano. Dessa forma, foi escolhida a citometria de fluxo para um ensaio piloto da avaliação do efeito dos exossomos no crescimento de *M. hyopneumoniae*. Entretanto, o ensaio piloto demonstrou uma grande variação na leitura das amostras quando os exossomos eram adicionados. Como a quantidade de exossomos era um fator limitante para o experimento e a variação encontrada exigia um grande número de amostras, essa estratégia foi abandonada na avaliação da influência de exossomos no crescimento bacteriano.

Dessa forma, com os resultados obtidos através de CCU, conclui-se que os exossomos não alteraram o crescimento dos micoplasmas suínos. No entanto, essa conclusão não é definitiva, pois há vários fatores que podem ter influenciado o resultado. O meio de cultura é um deles, pois possivelmente faltam componentes que permitam a multiplicação celular dos micoplasmas e em condições ideais de crescimento os exossomos poderiam ter outro efeito sobre as bactérias. O segundo fator, é a concentração de

exossomos adicionada ao meio de cultura. Foram escolhidas concentrações arbitrárias para os experimentos, baseadas na literatura. A limitação da quantidade de exossomos, que demanda uma grande quantidade de tempo e material, era um fator limitante para a realização de testes. Assim, se fossem usadas concentrações maiores de exossomos, possivelmente esses poderiam ter influência no crescimento dos micoplasmas. O último fator a se observar é o método de CCU. Como já observado, essa técnica apresenta baixa sensibilidade e pequenas mudanças no crescimento bacteriano poderiam não ser observadas. Além disso, os exossomos usados no experimento provinham de células suínas que não tinham sido desafiadas contra *M. hyopneumoniae*. Presumivelmente ocorrem alterações no conteúdo de vesículas liberadas por células infectadas, como indicam os resultados do sequenciamento de miRNAs (Capítulo 4.2), de forma que exossomos obtidos nessas condições poderiam produzir efeitos diferentes sobre o crescimento de *M. hyopneumoniae*. Sendo assim, novos testes devem ser feitos para avaliar se os exossomos interferem ou não no crescimento dos micoplasmas.

4.3.2.3 – Análise da internalização de exossomos por *M. hyopneumoniae*

Para investigar se os micoplasmas são capazes de internalizar os exossomos e seu conteúdo foram utilizadas as vesículas contendo a proteína GFP. Como as vesículas apresentavam fluorescência verde devido à expressão da proteína GFP, inicialmente buscou-se verificar se a proteína fluorescente poderia ser detectada em *M. hyopneumoniae* após a incubação com os exossomos. Para tal, a intensidade da fluorescência verde foi avaliada por citometria de fluxo. No entanto, foi verificado que os micoplasmas possuem uma fluorescência basal verde, impactando os controles, de modo que as análises foram inconclusivas.

Como não foi possível fazer a análise da fluorescência para detectar se *M. hyopneumoniae* estava internalizando o conteúdo dos exossomos, decidiu-se fazer um *western blot* com anticorpo contra a proteína GFP para averiguar se esta proteína era transferida para *M. hyopneumoniae*. A Figura 7 mostra o resultado do *western blot* e verifica-se que a proteína GFP foi detectada apenas no controle positivo (exossomos). Dessa forma, pode-se concluir que, nas condições testadas, não ocorreu a internalização das vesículas/proteína GFP adicionadas ao meio de cultura. Uma vez que foram

adicionados até 50 µg de exossomos contendo a proteína GFP, esperava-se que essa proteína fosse detectada no *western blot* caso ocorresse a internalização das vesículas pela bactéria. No entanto, esses resultados ainda precisam ser investigados por técnicas mais sensíveis, como microscopia confocal e microscopia eletrônica. Novamente ressalta-se que os exossomos usados no experimento eram provenientes de células suínas não desafiadas com *M. hyopneumoniae*, e que vesículas liberadas por células infectadas poderiam ter outro efeito na interação com o patógeno.

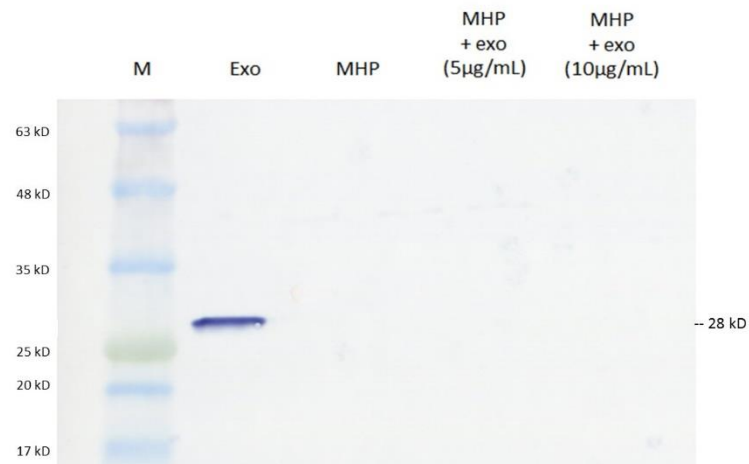


Figura 7. Western blot contra a proteína GFP. Uma banda de 28 kDa relativa à proteína GFP é identificada no controle positivo (exossomos), mas não nas amostras de *M. hyopneumoniae* incubadas com as vesículas. M – marcador de massa molecular.

5. DISCUSSÃO GERAL

As diferenças na patogenicidade entre as diversas espécies do gênero *Mycoplasma* são aspectos que chamam a atenção e merecem ser estudados. Em particular, destacamos o interesse em estudar as diferenças na patogenicidade e nos níveis de virulência entre espécies que ocupam o mesmo ambiente e que são muito similares, como os micoplasmas que habitam o trato respiratório suíno. *M. hyopneumoniae* é o agente causador da pneumonia enzoótica suína, entretanto a sua presença no hospedeiro nem sempre está relacionada à doença, sendo encontrado também em indivíduos sadios (PALZER *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2017). Além disso, apesar de diversas linhagens caracterizadas serem patogênicas, há linhagens que foram atenuadas após passagens seriadas em cultura (ZIELINSKI & ROSS, 1990; LIU *et al.*, 2013). *M. hyorhinis* também é associado com a ocorrência de pneumonia, embora não com a mesma intensidade que *M. hyopneumoniae*, além de ser causador de artrites e poliserosites em suínos (KOBISH & FRIIS, 1996; THACKER & MINION, 2012). *M. flocculare* é considerada uma espécie comensal, apesar de sua alta similaridade genética com *M. hyopneumoniae* (KOBISH & FRIIS, 1996).

A similaridade entre os micoplasmas do trato respiratório suíno, aliada aos diferentes níveis de virulência entre essas espécies, faz com que diversos estudos comparativos sejam realizados (LIU *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013, 2014; FERRARINI *et al.*, 2016; PAES *et al.*, 2016). Siqueira e colaboradores (2013) analisaram a semelhança dos genomas de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis*. Foram identificados diversos genes espécie-específicos nessas bactérias, principalmente em *M. hyorhinis*, o que pode explicar a diferença fenotípica entre esta e as outras espécies analisadas. No entanto, dentre os genes espécie-específicos não foram identificados genes com função conhecida e/ou relacionada à patogenicidade. Por outro lado, a maior parte das proteínas de superfície com função conhecida compartilhadas entre as três espécies corresponde a genes putativos relacionados à patogenicidade em *M. hyopneumoniae* e/ou *M. hyorhinis*, incluindo muitas adesinas e lipoproteínas – fato curioso, devido ao seu papel relacionado à virulência, à natureza não patogênica de *M. flocculare* e às diferenças de patogenicidade entre *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Esse dado é interessante, pois a diferença de patogenicidade entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* é muitas vezes atribuída às proteínas de adesão. No

entanto, ambas as espécies carregam um conjunto similar de adesinas, com exceção de uma cópia de P97 e de P102 ausentes em *M. flocculare* (SIQUEIRA *et al.*, 2013), e parecem se aderir de maneira similar ao epitélio ciliado do hospedeiro (YOUNG *et al.*, 2000). Embora existam variações nos níveis de expressão e processamento pós-traducional de adesinas, somente esses fatores não são suficientes para explicar as diferenças de patogenicidade das espécies analisadas nem os diferentes níveis de virulência entre linhagens de *M. hyopneumoniae*. É fato que as adesinas desempenham um papel importante na virulência e patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, mas seria mais correto propor que sua virulência é de natureza multifatorial e outros fatores devem estar implicados nessa função.

Entre os genes espécie-específicos identificados no genoma de *M. hyopneumoniae* estão os genes da via do catabolismo de mio-inositol (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Em seu estudo, Ferrarini e colaboradores (2016) identificaram através de modelagem matemática essa via como um dos aspectos que poderiam estar associados com a virulência aumentada de *M. hyopneumoniae* em relação a *M. flocculare* e *M. hyorhinis*. Outro aspecto identificado *in silico* pelos autores foi a conexão entre o metabolismo do glicerol e a glicólise com a consequente produção do metabólito tóxico peróxido de hidrogênio pela ação da enzima glpO em *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* (FERRARINI *et al.*, 2016). No presente trabalho, um dos objetivos foi testar experimentalmente esses dois aspectos e avaliar sua relação com as diferenças de patogenicidade entre as espécies de micoplasmas do trato respiratório suíno e com os diferentes níveis de virulência entre linhagens de *M. hyopneumoniae*.

Dentre as espécies do gênero *Mycoplasma* que possuem genomas sequenciados, *M. hyopneumoniae* é a única que possui os genes para o catabolismo de mio-inositol. Como as espécies pertencentes a esse gênero parecem manter apenas um conjunto mínimo de genes essenciais para seu metabolismo (RAZIN & HAYFLIK, 2010), acreditamos que a via do catabolismo de mio-inositol seja funcional em *M. hyopneumoniae* e por isso foi mantida nessa bactéria. Sendo assim, decidimos investigar se *M. hyopneumoniae* é capaz de utilizar mio-inositol como fonte de energia.

Mio-inositol é um poliol naturalmente presente em células de plantas e animais, tanto em sua forma livre quanto na forma ligada a fosfolipídeos ou derivados de inositol fosfato. Tem um papel importante em vários processos celulares, sendo componente de

diversas moléculas com função biológica, incluindo segundos mensageiros, como inositol trifosfato (IP₃), lipídeos de fosfatidilinositol fosfato (PIP₂/PIP₃) e possivelmente glicanos de inositol (CROZE & SOULAGE, 2013). Foi demonstrado que diversas bactérias, como *B. subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Salmonella enterica* e *Sinorhizobium meliloti*, podem usar mio-inositol como única fonte de carbono e energia (YEBRA *et al.*, 2007; YOSHIDA *et al.*, 2008; KRÖGER & FUCHS, 2009; KOHLER *et al.*, 2010). Além disso, o mio-inositol é uma molécula difundida na corrente sanguínea de mamíferos (REYNOLDS, 2009), o que o tornaria uma fonte de energia adequada para bactérias no extremamente vascularizado sistema respiratório.

Embora a organização dos genes responsáveis pelo catabolismo do mio-inositol possa variar entre os organismos, as principais reações dessa via são conservadas e compreendem sete etapas. Após a importação do mio-inositol por um transportador, essa molécula é oxidada em uma primeira etapa para 2-ceto-mio-inositol, catalisado pela enzima IolG (inositol-2-desidrogenase). Após vários passos adicionais, incluindo a clivagem e fosforilação do anel hexano, os produtos finais di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) e acetil coenzima-A (CoA) são canalizados para o metabolismo central da célula (MANSKE *et al.*, 2016). Em *M. hyopneumoniae*, os genes *iol*, responsáveis pelo catabolismo do mio-inositol, estão organizados em uma unidade transcricional completa, com exceção do gene que codifica a proteína IolJ, não encontrado nessa bactéria. IolJ (6-fosfo-5-desidro-2-desoxi-D-gluconato aldolase) é responsável pela parte final do metabolismo do mio-inositol, transformando DKGP (6-fosfo-5-desidro-2-desoxi-D-gluconato) em DHAP e malonato semialdeído (MSA), que é então transformado em acetil-CoA por ação da proteína IolA, última enzima dessa via (KRÖGER & FUCHS, 2009; MANSKE *et al.*, 2016).

Baseado em homologia de sequência, ortologia, sintenia e análises de estruturas tridimensionais das enzimas, nós propusemos um possível candidato para a enzima IolJ previamente não identificada em *M. hyopneumoniae*, nomeadamente, uma duplicação do gene *fba* que codifica a frutose-1,6-bisfosfato aldolase (Fba) da glicólise. Em outros organismos, o gene que codifica IolJ é similar ao gene que codifica a Fba (YOSHIDA *et al.*, 2008). Em *M. hyopneumoniae* há duas cópias anotadas para esse gene (*fba* e *fba-1*). Nossas análises estruturais mostraram que apesar de haver várias características comuns entre IolJ e Fba no modo de interação com o substrato, há resíduos de aminoácidos que

parecem ser essenciais para a interação de IolJ com seu substrato. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a enzima Fba-1 teria o papel de frutose-bisfosfato aldolase em *M. hyopneumoniae*, enquanto a enzima Fba seria mais similar à proteína IolJ, desempenhando a atividade dessa enzima nessa espécie bacteriana. Embora estudos funcionais sejam necessários para confirmar essa hipótese, a ausência de um gene que codifique IolJ também foi observada em *S. meliloti* (KOHLER *et al.*, 2010), em *S. enterica* (KRÖGER & FUCHS, 2009) e em *Legionella pneumophila* (MANSKE *et al.*, 2016), indicando que em outras bactérias que possuem os genes para o catabolismo de mio-inositol possa existir um gene que codifique IolJ que não esteja próximo aos demais genes da via.

Nossos resultados mostraram que *M. hyopneumoniae* é capaz de importar mio-inositol marcado quando cultivado em meio de cultura complexo. Além disso, mostramos que essa é a única entre as três espécies de *Mycoplasma* testadas capaz de utilizar mio-inositol como única fonte de energia. O método utilizado (quantificação de ATP) nos permitiu quantificar as células metabolicamente ativas e dessa forma determinar sua viabilidade nas condições testadas. Diferentemente da produção de peróxido de hidrogênio, esse parece ser um atributo geral das linhagens de *M. hyopneumoniae*. De fato, a linhagem atenuada J foi a linhagem que apresentou maior produção de ATP quando cultivada com mio-inositol como única fonte de carbono. Uma das razões que pode explicar isso é o fato que após passagens seriadas em cultura, essa bactéria parece ter mudado o seu foco para o metabolismo, e dessa forma desenvolveu habilidades de aproveitar o meio de cultura rico, enquanto que a habilidade de infectar o hospedeiro tornou-se menos importante, diminuindo a expressão dos genes relacionados à adesão (LI *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2009). O crescimento *in vitro* mais rápido da linhagem J em relação a outras linhagens de *M. hyopneumoniae* também foi identificado por Garcia-Morante e colaboradores (2018).

M. hyopneumoniae é capaz de persistir por mais tempo no hospedeiro se comparado às outras espécies de *Mycoplasma* do trato respiratório (LE CARROU *et al.*, 2006; OVERESCH & KUHNERT, 2017). Essa característica pode ser decorrente do uso de mio-inositol como fonte de energia por essa espécie. Foi demonstrado que a presença dos genes para o catabolismo do mio-inositol em *L. pneumophila* confere uma vantagem no *fitness* dessa espécie em situação de co-infecção com outras bactérias, desse modo colaborando na virulência desse patógeno (MANSKE *et al.*, 2016). Resultados similares foram reportados em *S. meliloti*, mostrando que os genes do catabolismo de mio-inositol

são necessários neste simbiote para uma competição bem-sucedida no processo de nodulação e colonização do hospedeiro (KOHLENER *et al.*, 2010). Além disso, o catabolismo de mio-inositol pode explicar a habilidade de *M. hyopneumoniae* de crescer em diversos sítios se comparado à *M. flocculare* (LE CARROU *et al.*, 2006). Sendo assim, esse é um aspecto que pode estar diretamente envolvido na virulência de *M. hyopneumoniae*.

O gene que codifica a enzima *glpO* está presente tanto no genoma de *M. hyopneumoniae* como no de *M. hyorhinis*. Apesar de estar anotada com a função de desidrogenase, nós propomos que essa enzima funcione como glicerol-3-fosfato oxidase nas espécies mencionadas, produzindo DHAP e peróxido de hidrogênio como seus produtos finais. No entanto, apesar da presença do gene *glpO* em *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, a produção de peróxido de hidrogênio foi detectada apenas no cultivo das linhagens patogênicas de *M. hyopneumoniae* em meio rico. Tanto *M. hyorhinis* quanto a linhagem atenuada J de *M. hyopneumoniae* não produziram níveis detectáveis de peróxido de hidrogênio nas condições testadas. Além disso, a produção celular do metabólito tóxico foi similar nas duas linhagens patogênicas de *M. hyopneumoniae* testadas (7448 e 7422). De nosso conhecimento, essa é a primeira vez que a produção de peróxido de hidrogênio por *M. hyopneumoniae* foi demonstrada *in vitro* (MAES *et al.*, 2017).

Como já mencionado, a produção de peróxido de hidrogênio a partir do metabolismo de glicerol foi descrita como essencial para a virulência e citotoxicidade de outras espécies de micoplasmas, como *M. mycoides* subsp. *mycoides* (VILEI & FREY, 2001; PILO *et al.*, 2005) e *M. pneumoniae* (HAMES *et al.*, 2009). Assim como em *M. pneumoniae* (HAMES *et al.*, 2009), demonstramos que a presença de glicerol é essencial para a produção de peróxido de hidrogênio pelas linhagens patogênicas de *M. hyopneumoniae*. Apenas uma quantidade mínima de peróxido de hidrogênio foi produzida na presença de glicose, e nenhuma quantidade desse metabólito tóxico foi detectada na ausência de fontes de carbono. Por outro lado, a adição de glicerol na concentração fisiológica (100 µM) (PILO *et al.*, 2005) resultou na produção de quantidades moderadas de peróxido de hidrogênio por *M. hyopneumoniae*, e a produção do metabólito aumentou quando concentrações maiores de glicerol estavam disponíveis.

Nós investigamos se a diferença na produção de peróxido de hidrogênio entre as linhagens patogênicas e atenuadas de *M. hyopneumoniae* era devido a diferenças na expressão no gene que codifica a enzima *glpO*. No entanto, os resultados mostram que não

houve diferenças significantes nos níveis de RNA transcritos do gene *glpO* nas diferentes linhagens de *M. hyopneumoniae*. Esses resultados estão de acordo com estudos de proteomas, que identificaram a presença de *glpO* em linhagens patogênicas e atenuadas de *M. hyopneumoniae* (232 e J) (PINTO *et al.*, 2009; PENDARVIS *et al.*, 2014). Isso pode ser um indicativo que essa proteína sofre modificações pós-tradução a fim de se tornar ativa ou inativa. Modificações pós-tradução já foram reportadas em diversas proteínas de *M. hyopneumoniae* (DJORDJEVIC *et al.*, 2004; BURNETT *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2007; TACCHI *et al.*, 2016) e esse pode ser o caso de *glpO*, pois dados de transcritômica e proteômica disponíveis na literatura não indicam nenhuma diferença esclarecedora nessa via entre linhagens ou espécies que explique porque ela é ativa em algumas linhagens e em outras não.

A disponibilidade intracelular de glicerol também pode influenciar na virulência dessas espécies. Em *M. mycoides* subsp. *mycoides*, esse fator impacta fortemente a virulência e patogenicidade de dois isolados dessa espécie. O isolado africano, mais patogênico, possui um transportador-ABC de alta afinidade para glicerol, permitindo uma utilização altamente eficiente desta fonte de carbono e a concomitante produção de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, o isolado europeu, bem menos patogênico, possui apenas um facilitador para a importação de glicerol, fazendo com que a disponibilidade intracelular dessa molécula seja menor em comparação ao isolado africano (VILEI & FREY, 2001). Em *M. hyopneumoniae*, a disponibilidade de glicerol intracelular também é maior do que em *M. hyorhinis* e *M. flocculare*. Enquanto *M. hyopneumoniae* possui seis maneiras diferentes de captar glicerol (desidrogenação de gliceraldeído, transportador-ABC de glicerol e glicerol-fosfato, proteína facilitadora para importação de glicerol, importação de glicerofosfoglicerol e glicerofosfocolina), as outras espécies não possuem ao menos duas dessas reações (FERRARINI *et al.*, 2016). Esse é um fator que pode limitar a taxa de produção de peróxido de hidrogênio em cada espécie. Desse modo, a patogenicidade aumentada de *M. hyopneumoniae* em relação a *M. hyorhinis* pode ser devido à produção de peróxido de hidrogênio resultante de uma maior absorção de glicerol como fonte de energia.

Além disso, a localização celular da proteína *glpO* também é importante no que diz respeito à virulência. Em *M. mycoides* subsp. *mycoides* a proteína *glpO* é ligada à membrana e está em contato próximo com o hospedeiro, sendo que uma quantidade

significativa de peróxido de hidrogênio é diretamente injetada nas células do hospedeiro (PILO *et al.*, 2005). Enquanto isso, em *M. pneumoniae*, uma espécie menos virulenta que a citada anteriormente, a proteína glpO é citoplasmática (HAMES *et al.*, 2009). *M. pneumoniae* não possui o transportador de alta eficiência de glicerol, de forma que a disponibilidade intracelular dessa fonte de carbono é menor, e concomitantemente, a produção de peróxido de hidrogênio (HAMES *et al.*, 2009). A diferença na produção do metabólito tóxico e na capacidade de exportá-lo diretamente para as células hospedeiras pode ajudar a explicar a diferença de patogenicidade entre essas duas bactérias. Em nossas análises, identificamos porções transmembrana na proteína glpO de *M. hyopneumoniae* por diferentes *softwares* de predição. Esse resultado nos permitem sugerir que a proteína glpO de *M. hyopneumoniae* localiza-se associada à membrana plasmática, dessa forma tendo contato próximo com as células do hospedeiro. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar a localização subcelular da proteína glpO nessa bactéria.

Como anteriormente assinalado, é importante ressaltar que os micoplasmas não possuem genes de virulência clássicos, como invasinas e citolisinas, mas que isso não impede que algumas espécies apresentem alta virulência, como é o caso de *M. mycoides* subsp. *mycoides* (PILO *et al.*, 2005). Esse fato destaca que os Mollicutes usam as funções fundamentais do seu metabolismo para garantir a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro e causar doença (BLOTZ & STULKE, 2017). Assim como *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. hyopneumoniae* é capaz de produzir peróxido de hidrogênio e pode usar essa característica a seu favor para garantir a sobrevivência no hospedeiro. A produção de peróxido de hidrogênio como subproduto da utilização de fontes de carbono é um processo que ocorre em diversas bactérias (PILO *et al.*, 2005; HAMES *et al.*, 2009; OKAHASHI *et al.*, 2013; HERTZBERGER *et al.*, 2014; SZCZEPANEK *et al.*, 2014) e foi proposto que isso pode representar uma vantagem seletiva para seus produtores: a exportação dessa molécula causa um ambiente antibacteriano severo que previne o crescimento de bactérias competidoras (BLOTZ & STULKE, 2017). Também pode ajudar a explicar porque embora *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* sejam capazes de se aderir de maneira similar às células do hospedeiro, apenas *M. hyopneumoniae* cause dano tecidual.

Recentemente, uma análise metagenômica da composição microbiana pulmonar de suínos reportou que *M. hyopneumoniae* é a espécie mais prevalente em pulmões de hospedeiros doentes e saudáveis (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Como já discutido, a utilização de

mio-inositol como fonte de energia pode colaborar para o *fitness* de *M. hyopneumoniae*. Em situações de infecção *in vivo*, com competição com outras espécies que apresentam crescimento mais rápido, a capacidade de *M. hyopneumoniae* de usar mio-inositol e glicerol como fontes de energia pode conferir vantagens adaptativas a essa bactéria. Enquanto outras espécies competem fortemente por glicose e carboidratos relacionados, *M. hyopneumoniae* teria todo o suprimento de mio-inositol a sua disposição. Quanto ao uso de glicerol como fonte de energia com consequente produção de peróxido de hidrogênio, isso resultaria em um ambiente tóxico para as bactérias competidoras, conferindo benefício para *M. hyopneumoniae*. Além disso, esse produto tóxico combinado com toxinas de outras bactérias presentes no sistema respiratório provavelmente recrutaria efetores imunes. Como *M. hyopneumoniae* tem mecanismos eficientes de evasão do sistema imune do hospedeiro (MAES *et al.*, 2017), as bactérias de crescimento rápido seriam eliminadas mais rapidamente e *M. hyopneumoniae* poderia persistir no hospedeiro por mais tempo que as espécies concorrentes. Esse também pode ser um dos motivos das infecções por *M. hyopneumoniae* serem mais severas quando em conjunto com infecções por outros patógenos (THACKER & MINION, 2012).

Embora saibamos que o metabolismo não é o único responsável pela virulência aumentada de *M. hyopneumoniae* em relação à *M. flocculare* e *M. hyorhinis* e que outros fatores estão presentes, como a habilidade de se aderir ao hospedeiro (LIU *et al.*, 2013) e a produção de cápsula polissacarídica (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982), acreditamos que os dois aspectos metabólicos explorados nesse trabalho colaborem com a virulência desta espécie bacteriana e possam ser essenciais para sua sobrevivência *in vivo*, afetando diretamente sua patogenicidade.

Os nossos resultados publicados na revista *Molecular Microbiology* indicam que apenas as linhagens patogênicas de *M. hyopneumoniae* produzem peróxido de hidrogênio em condições padrão de cultivo. No entanto, novas análises identificaram que em condições de estresse, a linhagem J de *M. hyopneumoniae*, considerada não-patogênica ou atenuada, também foi capaz de produzir esse metabólito tóxico. Sob estresse nutricional, quando glicerol era a única fonte de energia disponível, a linhagem J foi capaz de metabolizar esse álcool e produzir concentrações de peróxido de hidrogênio similares às produzidas pelas linhagens patogênicas 7448 e 7422. Além disso, a produção de peróxido de hidrogênio pela linhagem J também ocorreu quando esta bactéria foi cultivada em meio

mínimo (YUS+), no entanto em concentrações menores que as produzidas pelas linhagens patogênicas (Figura S3 do capítulo 4.2 – pág. 172). Isso indica que MHPJ parece utilizar preferencialmente glicose, quando esta está disponível, no entanto, quando necessário - como em situações de competição -, é capaz de utilizar glicerol como fonte de energia e dessa forma produzir peróxido de hidrogênio. Esse resultado está de acordo com os níveis de expressão do gene *glpO* em *M. hyopneumoniae* J, que não difere das linhagens patogênicas. Dessa forma, é possível que na condição de infecção das células suínas, quando teve que competir com estas por fontes de energia, a linhagem J de *M. hyopneumoniae* tenha consumido glicerol, produzindo assim peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio pode causar a degradação de proteínas e lesões no DNA por hidroxilação, bem como danos à membrana plasmática por peroxidação lipídica, o que pode levar à morte celular (BLOTZ & STULKE, 2017). Isso pode ajudar a explicar porque as células suínas infectadas com *M. hyopneumoniae* apresentaram tanto dano celular em nossos resultados, principalmente nas áreas com maior concentração de bactérias. A morfologia celular também parecia alterada nas células infectadas e pudemos observar morte celular aumentada. Já foi demonstrado que peróxido de hidrogênio pode servir como um sinal para a morte celular em células epiteliais pulmonares (WAGHRAY *et al.*, 2005). Esses efeitos foram observados após a infecção da linhagem celular NPTr com a linhagem J de *M. hyopneumoniae*. Embora estudos indiquem que essa linhagem não é capaz de se aderir às células do hospedeiro e de causar pneumonia *in vivo* (ZIENLINSKI & ROSS, 1990; YOUNG *et al.*, 2000), nossos resultados indicam que essa linhagem se adere às células epiteliais suínas, causando danos. Resultados similares já foram reportados anteriormente (BURNETT *et al.*, 2006). Possivelmente os danos às células hospedeiras seriam ainda mais pronunciados se uma linhagem mais patogênica, como 7448 ou 7422, tivesse sido usada nos ensaios de infecção, como indicam os resultados recentemente (LEAL *et al.*, 2018 – submetido à publicação).

A infecção das células epiteliais de traqueia com *M. hyopneumoniae* resultou na expressão diferencial de 511 genes ($p < 0,05$) identificados pelos dois métodos de análise utilizados (DESeq2 e EdgeR), dos quais 220 estavam com a expressão aumentada e 291 estavam com a expressão reduzida. Além dos genes identificados pelos dois métodos, 712 genes foram identificados como diferencialmente expressos apenas pelo DESeq2 (LOVE *et al.*, 2014) (280 com expressão aumentada e 432 com expressão diminuída) e 60 genes

foram identificados apenas pelo EdgeR (ROBINSON *et al.*, 2014) (21 com aumento de expressão e 39 com redução da expressão), totalizando 1.283 genes diferencialmente expressos. Dentre os genes que tiveram a expressão aumentada na condição de infecção, diversos são sabidamente envolvidos com a função imune e a resposta inflamatória, como o componente C3 do complemento, galectinas e quimiocinas.

A ativação do complemento é um dos principais mecanismos pelos quais o reconhecimento de patógenos é convertido em uma resposta à inflamação. O fator C3 é requerido para ativação das vias clássicas e alternativas da coagulação, sendo a principal e mais abundante proteína do sistema complemento, ligando-se aos micróbios para destruí-los (JANEWAY *et al.*, 2001; SARMA & WARD, 2011). Além disso, o aumento de sua expressão e de outros fatores do sistema complemento já foi observado em resposta à infecção por *M. pneumoniae*, representando um mecanismo de defesa precoce inespecífico do hospedeiro (LOOS & BRUNNER, 1979).

As galectinas são proteínas que podem se ligar a glicanos na superfície de microrganismos potencialmente patogênicos e mediar o reconhecimento e as funções efetoras da imunidade inata. As infecções bacterianas podem modular a expressão de galectinas, que por sua vez regulam a função de leucócitos e a resposta inflamatória (VASTA, 2009). Galectina-2 e galectina-8 tiveram a expressão aumentada durante a infecção com *M. hyopneumoniae*. Enquanto galectina-2 parece ter um efeito pró-apoptótico em linfócitos T e induzir citocinas pró-inflamatórias (STURM *et al.*, 2004), foi demonstrado que galectina-8 tem um papel na defesa celular contra infecções bacterianas, restringindo a proliferação de bactérias através de sua marcação para autofagia (THURSTON *et al.*, 2012).

Outro gene que teve a expressão aumentada na condição de infecção no nosso estudo e que é sabidamente relacionado com a resposta inflamatória é o gene que codifica a proteína amiloide sérica A3 (SAA3). Essa é uma proteína de fase aguda envolvida na homeostase das respostas inflamatórias e parece ser um componente vital de defesa do hospedeiro com propriedades protetoras anti-infecciosas (SOLER *et al.*, 2011; ERMAN *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que esse gene é marcadamente superexpresso na fase aguda da resposta inflamatória (KUSHNER, 1982). Além disso, a expressão aumentada de SAA3 já foi detectada em suínos infectados por bactérias gram-positivas e gram-negativas, inclusive no sistema respiratório (OLSEN *et al.*, 2013).

Quimiocinas, como CXCL2 e CCL20, também foram diferencialmente expressas na condição de infecção. As quimiocinas são consideradas reguladores chave da migração leucocitária, desempenhando papéis importantes em diversos processos fisiológicos e patológicos imunes e inflamatórios (GRAHAM, 2009). CXCL2 é uma quimiocina produzida em resposta à inflamação e infecção e tem sua expressão induzida em resposta a infecções por diversas bactérias, como *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella sp.* (CAI *et al.*, 2010; RYDSTROM & WICK, 2009). Sua expressão promove o acúmulo de neutrófilos e a depuração bacteriana nos pulmões (GREENBERGER *et al.*, 1996). Quanto a CCL20, sua expressão pode ser induzida por fatores microbianos, como LPS, e por citocinas inflamatórias, como TNF α e IFN γ (SCAPINI *et al.*, 2002). Essa quimiocina possui atividade quimiotática e antimicrobiana, sendo produzida no epitélio das vias aéreas em resposta a diversos agentes infecciosos e citocinas pró-inflamatórias (HIELPOS *et al.*, 2015). Estudos já reportaram a expressão aumentada de CCL20 em células epiteliais pulmonares em resposta a diversos agentes infecciosos (STARNER *et al.*, 2002; HIELPOS *et al.*, 2015; MACIEJWSKI *et al.*, 2017).

Além de genes com função imune, que já se esperava estarem superexpressos durante a infecção, diversos genes relacionados com a atividade de oxidação-redução tiveram a expressão induzida pela infecção com *M. hyopneumoniae*. Uma análise mais detalhada mostrou que a maior parte desses genes parecem estar sob o controle do fator de transcrição NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). NRF2 é um fator de transcrição que protege a célula contra danos oxidativos através da ativação da transcrição de genes citoprotetores (CHO *et al.*, 2006; MA, 2013). Em condições basais, ele é mantido no citoplasma através de ligação à proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) e marcado por ubiquitinação para ser degradado. Em resposta ao estresse oxidativo, as cisteínas reativas presentes em Keap1 são modificadas, gerando mudanças conformacionais no complexo formado por essas proteínas e liberando NRF2 que é então translocado para o núcleo (KENSLER *et al.*, 2007; BISWAL *et al.*, 2012). No núcleo, NRF2 forma um heterodímero com proteínas do tipo sMAF (*small MAF*) e se liga a elementos de resposta antioxidante (ARE) na região promotora de genes citoprotetores relacionados à neutralização ou detoxificação de metabólitos endógenos e toxinas ambientais, como genes que codificam enzimas de detoxificação de fase-II e genes antioxidantes, como heme-oxigenase (HO-1), superóxido dismutase (SOD) e NAD(P)H

quinona desidrogenase (NQO1) (CHO *et al.*, 2006; KENSLER *et al.*, 2007; COPPLE, 2012; MA, 2013). Além disso, NRF2 também pode ser regulado de forma independente de Keap1, por miRNAs (YANG *et al.*, 2011).

Dentre os muitos compostos que podem atuar ativando a via Keap1/NRF2 está o peróxido de hidrogênio (FOURQUET *et al.*, 2010). Como já discutido, peróxido de hidrogênio é produzido por *M. hyopneumoniae* e pode ter sido produzido por essa bactéria durante a infecção das células suínas. A presença desse metabólito detectada pelas células suínas poderia, então, levar a mudanças conformacionais na proteína Keap1 no citoplasma, dessa forma liberando o fator de transcrição NRF2 para se translocar ao núcleo e ativar a transcrição de seus genes alvo. Além disso, a infecção por *M. hyopneumoniae* é caracterizada por um grande número de leucócitos no tecido pulmonar, devido à produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por lipoproteínas de superfície (FERREIRA & CASTRO, 2007; MUNETA *et al.*, 2008). Os macrófagos e neutrófilos acumulados no tecido produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, causando danos teciduais (BISWAL *et al.*, 2012). Dessa forma, sistemicamente podem existir ainda mais gatilhos que levem à indução de defesas antioxidantes da célula durante a infecção por *M. hyopneumoniae*.

Diversos estudos relacionados a infecções bacterianas, principalmente pulmonares, mostraram que NRF2 é um fator crítico para montar a resposta imune inata no hospedeiro, sendo considerado um gene anti-inflamatório (THIMMULAPPA *et al.*, 2006; ATHALE *et al.*, 2012; MA, 2013; REDDY *et al.*, 2009). A expressão de genes efetores da resposta imune inata (citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e receptores) é desregulada nos pulmões de camundongos *knockout* para o gene *Nrf2* em resposta a estímulo por LPS. Conseqüentemente, há o aumento da inflamação e da mortalidade nessas condições (THIMMULAPPA *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que NRF2 é importante para a depuração bacteriana, sendo benéfico para o tratamento de infecções pulmonares (GOMEZ *et al.*, 2016). Além disso, a ativação da via de NRF2 já foi demonstrada em resposta a infecção com *Mycoplasma*, onde a lipoproteína MALP2 de *Mycoplasma fermentans* mostrou induzir a expressão de HO-1 em monócitos através da ativação por esse fator de transcrição (MA *et al.*, 2013).

NRF2 afeta diretamente a homeostase de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por meio da regulação dos sistemas de defesa antioxidante através de diversos

mecanismos. Estes incluem: (a) indução do catabolismo de superóxido e peróxido através de SOD, Prdx e GPx; (b) regeneração de cofatores e proteínas oxidadas, onde glutatona oxidada (GSSG) é reduzida por GSR, tiorredoxina oxidada por TrxR, e Prx-SO₂H por Srx; (c) síntese de fatores redutores, como glutatona reduzida (GSH) por GCLC e GCLM, e NADPH por G6PDH e 6PGD; (d) expressão da proteína antioxidante tiorredoxina e inibição da expressão do inibidor TXNIP; (e) aumento do transporte redox, como o transporte de cisteína/glutamato através de xCT; (f) quelação de metais por MT1, MT2 e ferritina; e (g) indução de proteínas de resposta ao estresse, como HO-1 (Hmox-1) (MA, 2013). A infecção com *M. hyopneumoniae* resultou no aumento da expressão de genes relacionados a todas essas funções nas células NPTr, com exceção de genes relacionados às funções (d) e (e).

Os genes putativos ativados por NRF2 que apresentaram um aumento da expressão durante a infecção por *M. hyopneumoniae* podem ser vistos na Tabela 3. Sequências próximas a sequência consenso do elemento ARE foram detectadas em todos os genes analisados (TG/TAnnnnGC) (Anexo 9.2).

Tabela 3. Genes regulados por NRF2 que apresentaram diferença de expressão durante a infecção de células NPTr por *M. hyopneumoniae*.

Gene	Descrição	DESeq2		EDGER	
		LogFC	Padj	LogFC	FDR
AKR1C4	aldo-ceto redutase família 1, membro C4	0,869	2,61E-76	0,949	3,07E-20
AKR1CL1	aldo-ceto redutase família 1, membro C1 like	0,866	3,96E-76	0,945	3,94E-20
PGD	fosfogluconato desidrogenase	0,611	3,62E-61	0,643	1,57E-10
EPHX1	epóxido hidrolase 1	0,444	5,20E-15	0,498	3,80E-07
FTH1	cadeia pesada de ferritina 1	0,436	1,81E-24	0,465	3,64E-14
FTL	cadeia leve de ferritina	0,427	1,25E-24	0,455	0,000452
TXNRD1	tiorredoxina redutase 1	0,426	7,45E-14	0,478	2,24E-13
NQO1	NAD(P)H quinona desidrogenase 1	0,415	7,89E-18	0,451	0,000326
GSTA1	glutatona S-transferase A1 like	0,407	1,02E-12	0,456	0,00144
UGT1A6	UDP glucoronosil transferase família 1, membro A6	0,367	1,88E-18	0,39	0,00036
AKR1C1	aldo-ceto redutase família 1, membro C1	0,36	0,000128	0,507	0,002702
PTGR1	prostaglandina redutase 1	0,358	6,02E-12	0,392	5,66E-05
GCLC	subunidade catalítica de glutamato-cisteína ligase	0,35	2,78E-10	0,388	6,30E-10
CES1	carboxilesterase 1	0,348	5,58E-12	0,379	0,015274

PIR	pirina	0,334	9,34E-07	0,388	1,80E-06
GSR	glutationa-dissulfeto redutase	0,314	0,002465	0,485	0,064875
SRXN1	sulfirredoxina 1	0,309	3,31E-06	0,355	1,93E-05
SLC6A6	transportador soluto família 6, membro 6	0,295	0,002355	0,408	0,010043
HMOX1	heme oxigenase 1	0,272	0,009346	0,397	0,114874
ALDH1A1	aldeído desidrogenase 1	0,261	1,47E-18	0,27	2,16E-09
BLVRB	biliverdina redutase B	0,259	0,0002	0,298	0,000714
PLAG2G7	fosfolipase A2 grupo VII	0,25	0,000458	0,289	0,001434
PRDX1	peroxirredoxina 1	0,231	1,02E-07	0,244	0,169509
GPX3	glutationa peroxidase 3	0,224	7,69E-05	0,246	0,165845
SLC5A10	transportador soluto família 5, membro 10	0,215	0,003209	0,247	0,012937
AKR7A2	aldo-ceto redutase família 7, membro A2	0,205	0,016877	0,247	0,053298
TKT	transcetolase	0,19	2,39E-06	0,2	0,327376
GGT1	glutationa hidrolase 1	0,178	0,019453	0,205	0,207994
TALDO1	transaldolase 1	0,177	0,003289	0,194	0,299277
PRDX5	peroxirredoxina 5	0,177	0,010407	0,199	0,036246
EGR1	proteína de resposta precoce ao crescimento 1	0,159	0,000252	0,168	3,80E-07
SLC5A6	transportador soluto família 5, membro 6	0,155	0,002364	0,165	0,322868
PRDX6	peroxirredoxina 6	0,151	0,001491	0,16	0,222118
HSP90AB1	proteína de choque térmico 90 família alfa, classe B, membro 1	0,149	0,000211	0,156	6,31E-09
CEBPB	proteína de ligação ao elemento reforçador CCAT	0,148	0,013159	0,161	0,527403
ME1	enzima málica 1	0,145	0,005302	0,155	0,539139
PRDX3	peroxirredoxina 3	0,139	0,013498	0,149	0,435901
SOD2	superóxido dismutase 2, mitocondrial	0,112	0,016564	0,119	0,717176
SLC40A1 *	transportador soluto família 40, membro 1	-0,365	1,23E-05	-0,462	3,19E-05

* Já foi demonstrado que NRF2 pode induzir a redução da expressão de SLC40A1 (WU *et al.*, 2017).

Através da análise da Tabela 3 pode-se observar que a infecção por *M. hyopneumoniae* leva ao aumento de expressão de diversos genes envolvidos nos dois maiores sistemas redox celulares: glutationa e tioredoxina. Também ocorre o aumento de expressão de genes envolvidos na regeneração de NADPH, usado por esses sistemas. Além disso, genes que codificam várias enzimas envolvidas com detoxificação, como GST, NQO1 e a família gênica AKR, estão com a expressão aumentada. Uma representação dos sistemas antioxidantes regulados por NRF2 pode ser observada na Figura 8.

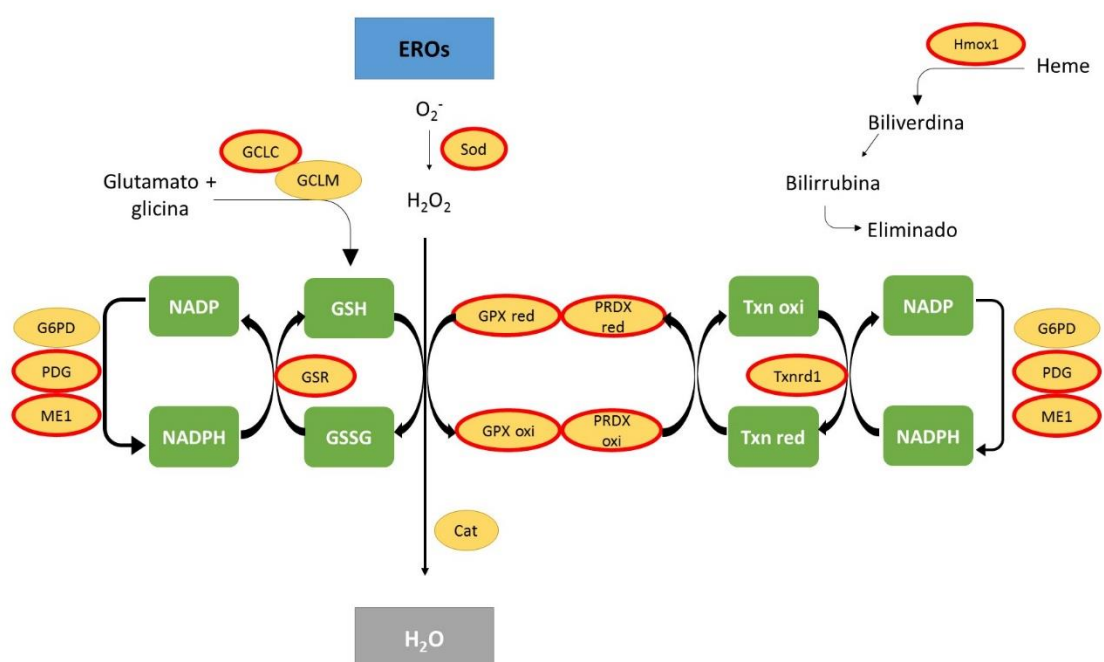


Figura 8. Diagrama esquemático representando as enzimas antioxidantes reguladas por NRF2. NRF2 é capaz de regular coordenadamente o aumento da expressão de diversos genes em resposta ao estresse oxidativo, como genes antioxidantes (SOD, heme oxigenase), genes associados com o metabolismo de glutatona (glutatona peroxidase, glutatona redutase, GCLC e GCLM), metabolismo de tiorredoxina (tiorredoxina redutase, peroxirredoxina) e enzimas que regeneram NADPH (glicose-6-fosfato desidrogenase, fosfogluconato desidrogenase e enzima málica 1). Além disso, genes de detoxificação xenobiótica, como GST, NQO1 e epóxido hidrolase também estão sob o controle desse fator de transcrição. Os genes que codificam as enzimas destacadas em vermelho apresentaram aumento de expressão durante a infecção com *M. hyopneumoniae*. Modificado de Kensler *et al.* (2007).

O sistema glutatona é o principal antioxidante endógeno que protege as células animais contra danos oxidativos (WU *et al.*, 2004). GSH sequestra várias espécies oxidativas, como superóxido, NO, radical hidroxil e ONOO⁻ (LU & HOLMGREN, 2014). O sistema é formado por três grupos de enzimas que catalisam a biossíntese de glutatona, transferem GSH para seus substratos e catalisam a redução de GSSG. Sob estresse oxidativo, GSH doa equivalentes redutores a enzimas de eliminação de radicais livres, como GPx e GST, e é convertida a sua forma oxidada (GSSG). GSSG pode ser convertida novamente a GSH por redução catalisada por glutatona redutase. Desse modo, a relação GSH/GSSG é usada para determinar os níveis celulares de estresse oxidativo (WU *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2016).

O sistema tiorredoxina é um sistema antioxidante fundamental contra o estresse oxidativo através de sua atividade de dissulfeto redutase, regulando o balanço proteico ditiol/dissulfeto (LU & HOLMGREN, 2014). Ele reduz pontes dissulfeto de várias proteínas e remove peróxido de hidrogênio e outros peróxidos utilizando NADPH como um doador de elétrons (ZHANG *et al.*, 2013). Esse sistema é composto principalmente por tiorredoxina, tiorredoxina redutase, peroxirredoxina e sulfirredoxina, sendo que tiorredoxina é o componente principal e os outros membros são responsáveis por mantê-la funcional (ZHANG *et al.*, 2013; LU & HOLMGREN, 2014). Além disso, já foi mostrado que pode haver interdependência entre os sistemas glutatona e tiorredoxina, sendo que um pode servir de *backup* um para o outro, fornecendo elétrons de forma cruzada quando necessário (KENSLER *et al.*, 2007; LU & HOLMGREN, 2014).

Proteínas como GST, NQO1 e AKR funcionam como um sistema de detoxificação celular. NQO1 catalisa a redução de quinonas para hidroquinonas, impedindo a formação de semiquinonas, que podem interagir com oxigênio molecular e formar espécies reativas capazes de induzir dano celular (ROSS & SIEGEL, 2017). GST, por sua vez, é responsável pela conjugação de glutatona a diversos substratos eletrofílicos e xenobióticos, com o objetivo de detoxificação (SHEEHAN *et al.*, 2001). As proteínas da família AKR são oxidoredutases que catalisam a redução dependente de NADPH de uma variedade de substratos. Elas também desativam espécies reativas de oxigênio prejudiciais, como compostos carbonil de lipídeos e proteínas, levando a sua eliminação (NONNEMAN *et al.*, 2006). HO-1 (Hmox) é uma enzima crítica que protege contra lesão celular e inflamação causada por heme livre, e a proteína sequestradora de ferro, ferritina, previne o descontrole nas concentrações celulares de ferro livre altamente reativo. A indução da expressão de ambas as proteínas é regulada por NRF2 (KENSLER *et al.*, 2007).

A predição de alvos de miRNAs diferencialmente expressos durante a infecção com *M. hyopneumoniae* identificou NRF2 como alvo de três miRNAs que estavam com a expressão diminuída em exossomos. Um desses miRNAs, miR-340, já foi identificado anteriormente regulando negativamente a expressão de NRF2 (SHI *et al.*, 2014). Para os outros dois miRNAs, miR-19a e miR-19b, ainda não foi demonstrada relação com esse fator de transcrição. Como exossomos funcionam como um meio de comunicação intercelular (PETHÕ *et al.*, 2018), a expressão diminuída de miRNAs nessas vesículas pode indicar que as células estão tentando comunicar às outras a necessidade de manter, ou

de não reprimir os alvos desses miRNAs. Desse modo, isso pode sugerir que as células infectadas estão tentando passar a mensagem da necessidade do fator de transcrição NRF2 para administrar as condições celulares ocasionadas pela infecção. A presença de miRNAs em exossomos regulando a resposta inflamatória em células receptoras já foi demonstrada (ALEXANDER *et al.*, 2015), no entanto, ressaltamos que essa é uma suposição altamente hipotética e mais estudos são necessários para explorar essa questão.

Além dos genes regulados por NRF2, outros genes relacionados ao controle do estresse oxidativo tiveram a expressão aumentada durante a infecção com *M. hyopneumoniae*. Esse é o caso do gene que codifica a proteína mitocondrial UCP2 (*uncoupling protein 2*). Essa proteína já mostrou ser recrutada durante a infecção em hepatócitos para diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio e dessa forma contrabalancear o estresse oxidativo (RUZICKA *et al.*, 2004), embora em macrófagos sua expressão esteja diminuída após a estimulação com LPS (EMRE & NÜBEL, 2010). UCP2 controla a ativação de células imunes pela modulação das vias de MAPK e produção de espécies reativas de oxigênio. Em diversos modelos de infecção, inflamação e autoimunidade, o efeito regulatório dessa proteína foi mostrado por sua implicação direta na produção de citocinas e óxido nítrico e na migração celular (EMRE & NÜBEL, 2010). Além disso, já foi demonstrado que UCP2 estaria envolvida na homeostase da glutatona, assim como NRF2 (CHEN *et al.*, 2016). Em adição a UCP2, selenoproteína M é outra proteína com aparente função de prevenção de dano oxidativo que teve sua expressão elevada durante a infecção. Essa proteína parece funcionar como oxidorreductase e previne danos causados por peróxido de hidrogênio em células neuronais (LABUNSKYY *et al.*, 2014).

A expressão de genes com funções relacionadas à defesa celular também foi induzida por *M. hyopneumoniae*. Um desses genes codifica a proteína MMP7 (*matrix metalloproteinase 7*). Essa proteína é expressa no epitélio e funciona como um sistema de defesa pela ativação de defensinas, que são peptídeos antibióticos que matam bactérias por ruptura de membrana. Na infecção pulmonar com *P. aeruginosa* e intestinal com *S. enterica* e *E. coli* há indução da expressão de MMP7 (ELKINGTON *et al.*, 2005; VANLAERE & LIBERT, 2009). Outro gene relacionado à defesa antimicrobiana induzido por *M. hyopneumoniae* é o que codifica a proteína ADM (*adrenomedullin*). Essa proteína é

expressa por diversas células epiteliais e já mostrou ação protetiva contra bactérias gram-positivas e negativas, como *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (ALLAKER *et al.*, 1999).

A análise dos genes que tiveram expressão diminuída durante a infecção das células suínas por *M. hyopneumoniae* identificou diversos genes relacionados ao citoesqueleto e aos cílios celulares. O trato respiratório dos mamíferos é protegido por mecanismos mucociliares que envolvem a integração do epitélio ciliar, fluído periciliar e muco. O muco age como uma barreira física e química em que partículas e organismos aderem. O revestimento ciliar do epitélio respiratório impulsiona o muco sobrejacente para a orofaringe, onde ele é engolido ou expectorado. A depuração mucociliar é perturbada se ocorrer qualquer mudança no número de cílios, sua estrutura ou movimento coordenado (LIANG *et al.*, 2012). Sabe-se que *M. hyopneumoniae* causa ciliostase (perda de movimento ciliar) e perda de cílios. Debey & Ross (1994) observaram que após infecção com *M. hyopneumoniae*, o epitélio ciliado de anéis de traqueia foi substituído por uma monocamada de células epiteliais cubóides a planas onde a superfície epitelial luminal foi danificada. Além disso, a presença de *M. hyopneumoniae* causa emaranhamento, aglutinação e divisão longitudinal nos cílios (YOUNG *et al.*, 2000). Uma das razões para os danos epiteliais e ciliares causados por *M. hyopneumoniae*, além da causa física, decorrente da adesão a essas estruturas, pode estar relacionada à mudança na expressão dos genes relacionados ao citoesqueleto e aos cílios, que em nosso estudo apresentaram expressão reduzida.

Para mediar a motilidade, os cílios possuem uma estrutura conhecida como axonema, composto por microtúbulos e proteínas associadas. Dentre as proteínas do axonema estão as dineínas, os motores moleculares essenciais para o batimento ciliar (KOBAYASHI & TAKEDA, 2012). As dineínas axonemais interagem com os microtúbulos adjacentes e geram uma força de deslizamento entre eles, produzindo o movimento de flexão necessário para que os cílios batam e impulsionem a célula ou outras partículas. Elas são formadas por múltiplas subunidades, compreendendo cadeias pesadas, leves e intermediárias (IBAÑEZ-TALLON *et al.*, 2003; KING, 2016). Defeitos nos cílios resultam em desordens conhecidas como ciliopatias e uma das causas mais comuns para os problemas de motilidade é a redução ou perda das dineínas axonemais (KOBAYASHI & TAKEDA, 2012). Após a infecção com *M. hyopneumoniae*, houve a diminuição da

expressão de diversos genes que codificam dineínas axonemais, tanto cadeias pesadas, quanto intermediárias e leves (DNAH11, DHAH12, DNAI2, DNAL1).

Além disso, houve a diminuição da expressão de outros genes necessários para a montagem da dineína axonemal e motilidade ciliar, como os genes que codificam DYX1C1, LRRC6 e MNS1. Foi verificado que mutações e deleção desses genes causam defeitos nos cílios, refletindo deficiências na montagem ou transporte de dineína (ZHOU *et al.*, 2012; TARKAR *et al.*, 2013; INABA *et al.*, 2016; YAMAMOTO *et al.*, 2017). Outro gene relacionado com alterações ciliares que apresentou expressão reduzida durante a infecção é o gene da adenilato quinase 7 (AK7). Foi demonstrado que mutações nesse gene estão relacionadas com fenótipos de ciliopatias; além disso, um estudo mostrou que a expressão desse gene estava reduzida em pacientes com discinesia ciliar primária (FERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2009; MILARA *et al.*, 2010). CEP162, DCDC2, MACF1 e IFT57, relacionados com a ciliogênese (WANG *et al.*, 2013; SCHUELER, *et al.*, 2015; MAY-SIMERA *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2018), e INTU, relacionado com a polarização ciliar (YASUNAGANA *et al.*, 2015), são genes cuja expressão também estava diminuída durante nossos ensaios de infecção, bem como o gene que codifica miosina 1D (MYO1D). Essa proteína é responsável pelo padrão de flexão unidirecional dos cílios, e foi visto que sua ausência causa movimento desordenado dos cílios da traqueia (HEGAN *et al.*, 2015). Dessa forma, *M. hyopneumoniae* parece causar a diminuição da expressão de diversos genes relacionados à estrutura e motilidade ciliar. Esse pode ser um dos fatores responsáveis pela ciliostase e perda de cílios causada após infecção por *M. hyopneumoniae*. A redução da expressão de proteínas ciliares, principalmente das dineínas, já foi relacionada a discinesias ciliares, mas ainda não tinha sido relatada na infecção por *M. hyopneumoniae*. Sendo assim, essa é uma questão que merece ser alvo de mais investigações, pois parece estar relacionada a um dos principais efeitos nocivos causados pela infecção por essa bactéria.

O citoesqueleto das células eucarióticas é composto de três componentes filamentosos principais: filamentos de actina, microtúbulos, e filamentos intermediários. Além de ser responsável pela sustentação e forma celular, o citoesqueleto também é usado como uma rede de transdução de sinal, podendo administrar agentes antimicrobianos a locais de infecção, ou distribuir receptores e outros elementos de mecanismos de resposta imune à membrana plasmática (JELENKSA *et al.*, 2014). Dessa forma, diversos patógenos

promovem o rearranjo do citoesqueleto das células hospedeiras. Na maior parte das vezes, o remodelamento do citoesqueleto é observado em infecções com patógenos intracelulares para propiciar sua entrada na célula. No entanto, algumas bactérias extracelulares também podem alvejar o citoesqueleto. *Yersinia* sp. usa moléculas efetoras para enfraquecer a maquinaria de actina, e dessa forma evitar a fagocitose e consequente degradação. Linhagens enteropatogênicas e enterohemorrágicas de *E. coli* sequestram o citoesqueleto de actina para formar um pedestal no local de adesão, ao qual se liga e multiplica. *Vibrio parahaemolyticus*, por sua vez, promove rearranjos de microfilamentos do citoesqueleto perturbando as junções de oclusão a fim de romper a barreira epitelial (FRANCO & SHUMAN, 2012; JELENKSA *et al.*, 2014). Recentemente, um estudo identificou que *M. hyopneumoniae* pode usar actina extracelular como um receptor (RAYMOND *et al.*, 2018). Os autores identificaram a co-localização de *M. hyopneumoniae* e actina extracelular em ensaios de infecção de células PK15. Actina foi identificada na superfície das células PK15 em localizações distintas que espelhavam o padrão de adesão de *M. hyopneumoniae*, sugerindo que a bactéria se aderiria a essas estruturas. Além disso, os autores verificaram que fragmentos da adesina P97 se ligam à actina. Também foram identificadas outras proteínas do citoesqueleto que se ligaram a proteínas de superfície de *M. hyopneumoniae*, como miosina, queratina e vimentina. Os resultados sugerem que actina extracelular pode ser um receptor importante para *M. hyopneumoniae*, principalmente após a destruição dos cílios (RAYMOND *et al.*, 2018).

Em pacientes infectados com *M. pneumoniae* foram verificados diversos tipos de anormalidades ultraestruturais ciliares (LIANG *et al.*, 2012), além disso, a intensidade do dano epitelial parece estar relacionada com a intensidade da infecção, sendo que pacientes que apresentavam infecções mais severas possuíam mais anormalidades epiteliais, prejudicando o funcionamento do aparelho mucociliar (JIANG *et al.*, 2014). Também já foi demonstrado que infecção com *M. penetrans*, que diferentemente de *M. hyopneumoniae* é uma espécie intracelular, pode causar reorganização no citoesqueleto das células infectadas, com agregação de tubulina e α -actina (GIRON *et al.*, 1996).

Nossos resultados mostram que *M. hyopneumoniae* causa alteração da expressão de diversos genes relacionados aos cílios e ao citoesqueleto, tanto de microtúbulos quanto de filamentos de actina, envolvidos na organização, rearranjo e estabilidade dessas estruturas. Novamente frisamos que apenas a adesão às células do hospedeiro não é

suficiente para causar danos teciduais, uma vez que *M. flocculare* se adere ao epitélio do hospedeiro de maneira similar a *M. hyopneumoniae*, mas sem causar perda de cílios. Desse modo, a mudança de expressão nos genes relacionados a citoesqueleto e cílios pode estar diretamente envolvida com os danos causados por *M. hyopneumoniae*. Não sabemos porque isso acontece nem quais mecanismos estão envolvidos nesse processo, de forma que mais estudos são necessários para investigar esse aspecto tão importante na patogenicidade dessa bactéria.

Outro processo relacionado com o citoesqueleto é a divisão celular. Diversos genes relacionados com divisão e ciclo celular tiveram a expressão reduzida durante a infecção com *M. hyopneumoniae*. Nas células eucarióticas, o ciclo celular é constituído pela interfase, que compreende as fases G1, S e G2, e pela fase mitótica (M). A progressão ao longo do ciclo celular é controlada pela ativação sequencial de um conjunto de quinases dependentes de ciclina (CDKs) (SWEENEY *et al.*, 1996). A ciclina A2 ativa duas CDKs diferentes e promove as transições de fase G1/S e G2/M. Sua superexpressão está relacionada com a proliferação celular aumentada e sua regulação negativa induz uma parada do ciclo celular em G2 (FUNG *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram a diminuição da expressão dessa ciclina, afetando a progressão do ciclo celular e inibindo a proliferação celular. A ciclina B1, essencial para o controle da transição G2/M (WANG *et al.*, 2014), também apresentou expressão reduzida. Por outro lado, a ciclina G2 regula negativamente a progressão do ciclo celular (SUN *et al.*, 2014; HASEGAWA *et al.*, 2015), e o gene que codifica essa ciclina também estava com a expressão diminuída em nossos resultados. Embora esses genes pareçam ter efeitos opostos, esse resultado indica que, de uma maneira geral, ocorre desregulação dos genes envolvidos no controle do ciclo celular durante a infecção com *M. hyopneumoniae*.

Interessantemente, um estudo mostrou que a depleção de ciclina A2 tem um segundo efeito, além da regulação do ciclo celular. Esse efeito envolve mudanças morfológicas que refletem modificações no citoesqueleto, em particular redistribuição de fibras de actina e vinculina. Esse papel seria independente de ligação a CDK e mediado pela ligação de ciclina A2 a RhoA, uma GTPase que regula a morfologia celular, citocinese e mobilidade celular através da organização de filamentos de actina (ARSIC *et al.*, 2012). Nas células depletadas de ciclina A2 houve uma mudança na distribuição dos feixes de actina, que passaram a exibir uma localização cortical. Esse efeito também foi

associado com a redistribuição de vinculina, relacionada aos complexos de adesão (ARSIC *et al.*, 2012). Enquanto nesse trabalho a atividade de RhoA foi reduzida após a depleção de ciclina A2, em nossos resultados houve o aumento da expressão desse gene, embora a expressão de ciclina A2 esteja reduzida. Curiosamente, a expressão de genes que codificam GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e GAPs (*GTPase-activating proteins*), necessários para a ativação da GTPase e aceleração da hidrólise de GTP (SCHMIDT & HALL, 2002), tiveram a expressão diminuída durante a infecção. Desse modo, embora o gene que codifica a GTPase tenha apresentado expressão aumentada, isso não significa que ocorreu o aumento da atividade dessa proteína, podendo inclusive ocorrer o contrário, pois as proteínas responsáveis pela regulação de sua atividade (TRIO, STARD13 e ARAP2) apresentaram expressão reduzida. No estudo sobre depleção de ciclina A2, os autores demonstraram que a redução da atividade de RhoA estava ligada à diminuição da fração de RhoA ligada a GTP, sendo que a restauração dessa fração recuperou o fenótipo do citoesqueleto. Além disso, os dados sugerem que ciclina A2 potencializa a atividade de troca GDP-GTP das GEFs, promovendo um estado ativado de RhoA (ARSIC *et al.*, 2012). RhoA é responsável por diversos processos celulares, como organização do citoesqueleto e progressão do ciclo celular, polaridade, adesão e migração. Seu papel na divisão celular está ligado à organização do citoesqueleto de actina, sendo também essencial para regulação da organização e dinâmica dos microtúbulos (ZHANG *et al.*, 2014). Seria interessante investigar a atividade dessa proteína durante a infecção com *M. hyopneumoniae*, visto seu papel na organização do citoesqueleto e divisão celular, que parecem estar alteradas durante a infecção, e ao fato de que ocorrem alterações na expressão do gene que a codifica, bem como na expressão gênica de diversas proteínas envolvidas na sua regulação.

A perturbação dos filamentos de actina está relacionada com o atraso na progressão da mitose em células eucarióticas, sugerindo que um citoesqueleto de actina intacto talvez seja requerido para o início eficiente da mitose (HENG & KOH, 2010). Além disso, sabe-se que durante a fase mitótica do ciclo celular ocorre um aumento de expressão global de genes que codificam proteínas motoras dependentes de microtúbulos que afetam fisicamente a segregação cromossômica, incluindo diversas cinesinas conhecidas por interagir diretamente com os centrômeros. Também ocorre o aumento da expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular, como os genes da família

CCNA, na transição da fase G2 para a fase M do ciclo celular (CHO *et al.*, 2001). No entanto, diversos genes envolvidos nesses aspectos tiveram a expressão reduzida nos nossos resultados. Também genes relacionados com a organização do citoesqueleto de actina, como os genes GEM, STARD13 e TRIO, apresentaram diminuição da expressão durante a infecção. Em conjunto, esses dados sugerem uma repressão da divisão celular durante a infecção por *M. hyopneumoniae*.

Diversos genes associados a proteínas do citoesqueleto e importantes para a divisão celular mostraram expressão reduzida durante a infecção com *M. hyopneumoniae*: GAS2L3 é uma proteína que interage com actina e microtúbulos e faz parte do fuso durante a mitose, e cuja diminuição da expressão causa perda cromossômica e aneuploidia (WOLTER *et al.*, 2012); ASPM é uma proteína associada aos microtúbulos, estando envolvida na sua organização durante a formação do fuso e na citocinese (XU *et al.*, 2012); TPX2 estimula a montagem de microtúbulos durante a formação do fuso mitótico (WADSWORTH, 2015); MYO10, se liga à actina e aos microtúbulos, estando presente nos polos do fuso mitótico, sendo que a redução de sua expressão causa defeitos como a fragmentação do fuso (WOOLNER *et al.*, 2008). De forma geral, isso mostra que actina e microtúbulos são importantes para a separação cromossômica durante a mitose (HENG & KOH, 2010).

A segregação errada de cromátides irmãs durante a mitose resulta em aneuploidia, ou seja, a perda ou ganho de cromossomos nas células filhas. Esse desfecho é evitado pelo *checkpoint* para montagem do fuso mitótico, que impede a entrada na anáfase até que todos os cromossomos estejam completamente alinhados (BOLANOS-GARCIA & BLUNDELL, 2011). Uma estrutura necessária para a segregação cromossômica é o cinetócoro, uma grande estrutura proteica que se forma em centrômeros e faz ligações estáveis aos microtúbulos do fuso. O sinal do *checkpoint* do fuso mitótico impede a progressão da mitose até que todos os cinetócoros estejam ligados ao fuso (MATSON & STUKENBERG, 2014). A proteína BUB1B tem um papel central nesse processo, em particular na estabilização da conexão entre o cinetócoro e os microtúbulos e no alinhamento dos cromossomos (MYSLINSKI *et al.*, 2007; BOLANOS-GARCIA & BLUNDELL, 2011). A proteína CENP-I, por sua vez, é importante para formação dos centrômeros e para gerar o sinal de *checkpoint* do fuso mitótico, sendo que sua deleção pode causar a parada da mitose (NISHIHASHI *et al.*, 2002; MATSON & STUKENBERG,

2014). NEK2, associada com os centrômeros e SPAG5 (*astrin*), associada com o cinetócoro, também estão envolvidas na formação do fuso mitótico (MACK & COMPTON, 2001; KIM *et al.*, 2002). Durante a infecção com *M. hyopneumoniae*, ocorreu uma diminuição da expressão dos genes que codificam todas essas proteínas. A expressão de BUB1B e de NEK2 é variável ao longo do ciclo celular, sendo praticamente indetectável em G1 e com um pico em G2/M (SCHULTS *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 2002; MYSLINSKI *et al.*, 2007). Esses dados podem ser mais um indicativo de repressão na divisão das células infectadas.

Patógenos já foram identificados manipulando o ciclo celular do hospedeiro para seu benefício, atuando de várias maneiras, como a liberação de toxinas, associação com microtúbulos, ou bloqueio de *checkpoints* do ciclo celular (JONES *et al.*, 2007). Embora os vírus tenham mais acesso à maquinaria celular, patógenos bacterianos também podem atuar alterando o ciclo celular do hospedeiro. Linhagens patogênicas de *E. coli* e de *S. aureus* podem bloquear o ciclo celular na transição das fases G2/M, e *Helicobacter pylori* pode bloquear as células na fase G1/S (SHIRIN *et al.*, 1999; MARCHÈS *et al.*, 2003; ALEKSEEVA *et al.*, 2013). Também foi visto que *Neisseria gonorrhoeae* pode induzir uma parada em G1 de células epiteliais humanas (JONES *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que o sobrenadante do cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pode induzir a parada de ciclo celular em G2/M em uma linhagem de células epiteliais, inibindo a replicação viral (BARBOSA *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível que *M. hyopneumoniae* também esteja interferindo no ciclo celular do hospedeiro, como nossos resultados sugerem. No entanto, mais experimentos são necessários para que se possam tirar conclusões sobre os efeitos dessa bactéria no ciclo celular das células suínas infectadas.

A perturbação de genes que codificam proteínas do citoesqueleto também pode ter relação com a ativação de NRF2. Como já mencionado, em condições basais NRF2 é sequestrada no citoplasma por Keap1, e essa proteína é ligada ao citoesqueleto de actina. Kang e colaboradores (2004) identificaram que Keap1 interage com filamentos de actina através de seu domínio DGR (*double glycine repeat*). Os autores observaram que actina é um suporte necessário para Keap1 manter NRF2 no citoplasma, e que a perturbação dos filamentos de actina aumenta a translocação nuclear de NRF2 (KANG *et al.*, 2004). Dessa

forma, a alteração da expressão de genes relacionados ao citoesqueleto pode ser mais uma indicação da indução da expressão de genes antioxidantes através da ativação de NRF2.

Outro aspecto observado em nossos resultados foi que mesmo com a infecção há redução da expressão de genes relacionados à apoptose. Ao mesmo tempo, há o aumento da expressão de genes relacionados com a glicólise. Esses dois efeitos podem estar relacionados, pois já foi identificado que a expressão do gene pró-apoptótico PUMA (BBC3) é regulado pelo metabolismo da glicose. Foi verificado que o consumo de glicose regula negativamente a expressão de PUMA, reduzindo a apoptose. PUMA é regulado por p53, e embora os níveis de expressão desse gene não sejam alterados, a atividade de p53 pode ser suprimida pelo metabolismo elevado de glicose, indicando que essa proteína pode ser metabolicamente regulada, e dessa forma levar à inibição da indução de PUMA, promovendo um efeito anti-apoptótico (ZHAO *et al.*, 2008).

Os resultados das análises de GO (*Gene Ontology*) realizadas estão de acordo com as discussões que propusemos sobre os genes diferencialmente expressos. Examinando os termos de GO dos genes que apresentaram redução de expressão durante a infecção com *M. hyopneumoniae*, pode-se ver que há o enriquecimento de termos relacionados ao citoesqueleto e projeções celulares, bem como ciclo celular e mitose. Isso indica que essas funções estão diminuídas durante a infecção e corroboram a discussão que fizemos até então. A repressão da tradução também é um termo que aparece nas análises de GO dos genes com níveis de transcrição diminuídos, e isso está de acordo com as análises de enriquecimento de GO dos genes que apresentaram aumento de expressão durante a infecção, que mostra vários termos relacionados a ribossomos, processos biossintéticos e tradução. Também aparecem termos relacionados à atividade de oxidoredutase, de acordo com os diversos genes antioxidantes que tiveram expressão aumentada. Interessantemente, também aparecem termos ligados aos exossomos, indicando maior envolvimento dessas vesículas durante a infecção.

Durante as análises, percebemos que o *fold change* (FC) dos genes diferencialmente expressos não foi extremamente elevado; pelo contrário, foram obtidos FCs considerados baixos. No entanto, consideramos que isso ocorreu porque usamos para os ensaios de infecção uma linhagem atenuada de *M. hyopneumoniae*. Contudo, mesmo que essa linhagem seja considerada não-patogênica, ela gera uma resposta imune considerável. Situação semelhante ocorre na produção de vacinas, em que são usadas

linhagens atenuadas para a geração da resposta imune sem causar efeitos prejudiciais. Dessa forma, acreditamos que infecções com linhagens patogênicas de *M. hyopneumoniae* gerem um efeito mais pronunciado nas alterações de expressão gênica, com FCs mais altos. No entanto, nossos resultados continuam relevantes, pois mostram uma visão geral do que a infecção por *M. hyopneumoniae* causa na célula hospedeira.

Para a análise de miRNAs suínos afetados pela infecção com *M. hyopneumoniae* consideramos que seria interessante analisar além de miRNAs intracelulares, o efeito da infecção em miRNAs do meio extracelular total (contendo microvesículas, exossomos, demais tipos de vesículas, bem como miRNAs livres em solução) e também os miRNAs contidos em exossomos. Nossa intenção era também sequenciar os miRNAs provenientes do sobrenadante da ultracentrifugação dos exossomos, que conteria apenas miRNAs livres em solução. No entanto, essas amostras apresentaram problemas, provavelmente devido à presença de RNases no meio extracelular e às diversas etapas de pré-processamento, de forma que uma das amostras não produziu número suficiente de *reads* no sequenciamento. Dessa forma, essa condição (miRNAs livres em solução) não foi usada para as análises subsequentes.

Nas análises de miRNAs das células suínas, foram detectados 1.221 miRNAs nas 14 bibliotecas de sRNAs sequenciadas. Além dos 411 miRNAs suínos depositados no miRBase versão 21 (KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2014), os sRNAs sequenciados foram mapeados contra os miRNAs suínos experimentalmente identificados por Martini e colaboradores (2014). As sequências que não foram mapeadas foram usadas para a predição de novos miRNAs, identificando 773 novos miRNAs putativos. As predições de miRNAs foram feitas a partir das bibliotecas de sRNAs intracelulares, pois estas apresentavam a melhor distribuição de tamanhos de acordo com miRNAs. As bibliotecas de sRNAs extracelulares e de exossomos apresentavam uma distribuição de tamanho que indicava certa degradação, de forma que não eram ideais para as predições. Uma vez feitas as predições de miRNAs, estes foram mapeados também nas bibliotecas de sRNAs extracelulares e de exossomos.

Dos 1.221 miRNAs mapeados, foram identificados 170 miRNAs diferencialmente expressos ($p < 0.05$), sendo que 121 apresentaram expressão aumentada e 49 tiveram a expressão reduzida. Estes serão identificados a partir de agora respectivamente como miRNAs *up-regulated* e miRNAs *down-regulated*. Destes, 44 miRNAs estavam

depositados no miRBase (11 *up-regulated* e 33 *down-regulated*), 37 foram identificados por Martini e colaboradores (2014) (22 *up-regulated* e 15 *down-regulated*) e 89 foram novas predições (88 *up-regulated* e 1 *down-regulated*). A maior parte dos miRNAs diferencialmente expressos foi detectada nas amostras extracelulares e de exossomos, sendo que nas amostras intracelulares foram detectados apenas 19 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 17 *up-regulated* e apenas 2 *down-regulated*. Destes, dois estão depositados no miRBase, o ssc-miR-184, *down-regulated*, e o ssc-miR-146a-5p, *up-regulated*. O segundo miRNA *down-regulated* faz parte dos miRNAs identificados por Martini e colaboradores (2014), bem como dois dos miRNAs *up-regulated*, e os demais miRNAs *up-regulated* são novas predições feitas por este trabalho. Curiosamente, o miR-146a-5p teve a expressão aumentada apenas nas amostras de miRNAs intracelulares, enquanto os demais miRNAs intracelulares *up-regulated* também foram detectados nas amostras extracelulares e de exossomos. O mesmo ocorre com o miR-184, *down-regulated* apenas nas bibliotecas intracelulares.

O miR-146 é um dos miRNAs mais comumente identificados em resposta a infecções, juntamente com miR-155 (DUVAL *et al.*, 2016), de forma que já era esperado que sua expressão estivesse aumentada durante a infecção. Curiosamente, miR-155 não demonstrou mudança de expressão nos nossos resultados. MiR-146 é induzido por níveis subinflamatórios de NF- κ B, tendo um papel essencial na regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias. Esse miRNA parece desempenhar um papel na tolerância imunológica, protegendo o organismo contra o choque séptico e modulando a severidade da resposta imune (LEE *et al.*, 2016; DUVAL *et al.*, 2016). Além disso, o aumento da expressão de miR-146a já foi observado após a infecção de células epiteliais de traqueia com *Mycoplasma gallisepticum* (MAJUMDER *et al.*, 2014). O miR-184, por sua vez, parece estar envolvido na regulação da tradução. Além disso, o aumento de sua expressão já foi relacionado ao aumento da proliferação celular e com o aumento da expressão de proteínas que regulam o ciclo celular (WEITZEL *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2014).

Quanto aos miRNAs das amostras extracelulares, foram detectados 127 miRNAs diferencialmente expressos, dos quais 119 estavam *up-regulated* e 8 estavam *down-regulated*. Destes, a maior parte estava diferencialmente expressa apenas nas amostras extracelulares (76 miRNAs *up-regulated* e 1 miRNA *down-regulated*).

Sobre os miRNAs encontrados em exossomos, a análise de expressão diferencial foi feita por GFOLD (FENG *et al.*, 2012), que fornece um ranqueamento dos miRNAs diferencialmente expressos, pois essas bibliotecas representavam *pools* de amostras. Foram detectados 91 miRNAs diferencialmente expressos nos exossomos, dos quais 43 estavam *up-regulated* e 48 estavam *down-regulated*. Dentre os miRNAs com expressão aumentada, todos são encontrados nas amostras extracelulares, com exceção de um, o miRNA 11-dna-24, que é um novo miRNA candidato predito neste trabalho. Dos miRNAs *down-regulated*, a maioria foi encontrada diferencialmente expressa somente em exossomos (41 miRNAs). Curiosamente, o miRNA ssc-miR-9842 estava com a expressão diminuída em exossomos, mas aumentada nas amostras extracelulares. No entanto, não existem dados na literatura sobre esse miRNA, limitando nossa discussão.

Também foram realizadas predições de alvos para os miRNAs diferencialmente expressos detectados em nossas amostras. Foram preditos no total 59.304 alvos para os 170 miRNAs diferencialmente expressos. Destes alvos, 1.682 estavam em genes diferencialmente expressos nos nossos resultados. Para as análises, foram utilizadas somente as interações permissivas e repressivas entre miRNAs e mRNAs. Embora existam situações em que ambos, mRNA e miRNA, estejam diferencialmente expressos no mesmo sentido (*up*→*up* ou *down*→*down*) e estas representem formas de regulação gênica, elas não serão aqui discutidas, uma vez que na literatura a grande maioria das interações validadas experimentalmente descrevem pares de miRNA-mRNA que possuem expressão em sentidos inversos (*up*→*down* ou *down*→*up*). Dessa forma, foram identificadas 321 interações permissivas e 721 interações repressivas entre miRNAs e mRNAs diferencialmente expressos. As interações permissivas representam 135 genes e 49 miRNAs diferentes, enquanto que as interações repressivas acontecem entre 204 genes e 120 miRNAs diferentes. Isso significa que apenas um dos miRNAs diferencialmente expressos detectados, o miRNA 6-dna-79 – uma nova predição –, não tem alvos nos genes diferencialmente expressos identificados.

Ao analisar as interações permissivas, percebemos que diversos genes regulados por NRF2 são alvos de miRNAs diferencialmente expressos. Foram identificados 40 alvos em 19 genes diferentes regulados por NRF2. Desse modo, parece que durante a infecção ocorre uma alteração global de expressão na tentativa de ativar genes com função antioxidante. Além do aumento da expressão de genes com essa função, especialmente os

regulados por NRF2, também ocorre a redução da expressão de miRNAs que regulam negativamente genes antioxidantes, indicando a importância da ativação dessa função durante a infecção com *M. hyopneumoniae*. A lista mostrando os genes regulados por NRF2 alvos de miRNA diferencialmente expressos pode ser verificada na Tabela 4.

Tabela 4. Genes superexpressos regulados por NRF2 que são alvos de miRNAs *down-regulated* durante a infecção com *M. hyopneumoniae*.

Gene ID	miRNA	Expressão do miRNA		
		Intracelular	Extracelular	Exossomos
AKR1C4	ssc-miR-31	NA	Down-regulated	Down-regulated
AKR1CL1	ssc-miR-31	NA	Down-regulated	Down-regulated
BLVRB	prediction_13_40037950_40 038026_-_3p-353-MC antisense-ssc-mir-	NA	NA	Down-regulated
EGR1	423_12_44150500_44150579 _-_NA-353-MC	NA	NA	Down-regulated
GCLC	ssc-miR-148b-3p	NA	NA	Down-regulated
GCLC	ssc-miR-19a	NA	NA	Down-regulated
GCLC	ssc-miR-19b	NA	NA	Down-regulated
GGT1	ssc-miR-338	NA	NA	Down-regulated
GGT1	ssc-miR-140-3p	NA	NA	Down-regulated
GGT1	ssc-mir-92-shorter/ssc-isomir- 92_X_108178486_108178565 _-_NA;ssc-mir-92-shorter/ssc- isomir-	NA	NA	Down-regulated
GGT1	92_X_108212408_108212487 _-_NA-424-HC	NA	NA	Down-regulated
GGT1	ssc-miR-92a	NA	NA	Down-regulated
GGT1	prediction_7_91732076_917 32132+_5p-353-MC	NA	NA	Down-regulated
GGT1	ssc-miR-31	NA	Down-regulated	Down-regulated
GGT1	antisense-pn8/bta-mir- 2320_6_43886629_43886722 _-_NA-424-HC	NA	Down-regulated	Down-regulated
HMOX1	ssc-miR-182	NA	NA	Down-regulated
HSP90AB1	ssc-miR-101	NA	Down-regulated	Down-regulated
NQO1	ssc-miR-34a	NA	NA	Down-regulated
PGD	ssc-miR-769-3p	NA	Down-regulated	NA
PIR	ssc-miR-378	NA	NA	Down-regulated
PRDX1	ssc-miR-101	NA	Down-regulated	Down-regulated
PRDX6	ssc-miR-10a-5p	NA	NA	Down-regulated
PRDX6	ssc-miR-10b	NA	NA	Down-regulated
PRDX6	ssc-miR-338	NA	NA	Down-regulated
SLC5A10	ssc-miR-1307	NA	NA	Down-regulated
SLC5A10	antisense-pn8/bta-mir-	NA	Down-regulated	Down-regulated

	2320_6_43886629_43886722			
	_ _NA-424-HC			
SLC5A6	ssc-miR-10b	NA	NA	Down-regulated
SLC5A6	ssc-miR-338	NA	NA	Down-regulated
SLC5A6	ssc-miR-423-3p	NA	NA	Down-regulated
SLC5A6	ssc-miR-27b-3p	NA	NA	Down-regulated
SLC5A6	prediction_7_91732076_917	NA	NA	Down-regulated
	32132+_5p-353-MC			
SLC6A6	ssc-miR-340	NA	NA	Down-regulated
	antisense-ssc-mir-			
TKT	423_12_44150500_44150579	NA	NA	Down-regulated
	_ _NA-353-MC			
TXNRD1	ssc-miR-103	NA	NA	Down-regulated
TXNRD1	ssc-miR-182	NA	NA	Down-regulated
	ssc-mir-107-shorter/ssc-			
TXNRD1	isomir-			
	107_14_106321702_1063217	NA	Down-regulated	Down-regulated
	88_ _NA-424-HC			
TXNRD1	ssc-miR-107	NA	Down-regulated	Down-regulated
TXNRD1	ssc-miR-31	NA	Down-regulated	Down-regulated
UGT1A6	ssc-miR-28-3p	NA	NA	Down-regulated
	antisense-ssc-mir-			
UGT1A6	103_16_52667657_52667738	NA	NA	Down-regulated
	_+_NA-424-HC			
UGT1A6	ssc-miR-769-3p	NA	Down-regulated	NA

Observando a Tabela 4, percebemos que alguns miRNAs se repetem, indicando que podem estar envolvidos na regulação de mais de um gene com função antioxidante. Dentre esses, o miRNA que alveja mais genes é o miR-31, que possui alvos nos genes AKR1C4, AKR1CL1, GGT1 e TXNRD1. No entanto, interações entre miR-31 e esses genes ainda não foram identificadas experimentalmente.

A predição de alvos para miRNAs apontou os genes que codificam HSP90AB1 e peroxirredoxina 1, regulados por NRF2, como alvos de miR-101. Não foram encontradas na literatura informações sobre miR-101 regulando esses genes. No entanto, um estudo indica que esse miRNA liga-se à região 3'UTR de NRF2 e regula negativamente esse transcrito (GAO *et al.*, 2017). MiR-92a, que potencialmente regula GGT1, também foi identificado regulando negativamente NRF2, assim como miR-27b, miR-28 e miR-34a (YANG *et al.*, 2011; ALURAL *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017b). Como a expressão desses miRNAs está diminuída, esse é mais um indicativo da ativação deste fator de transcrição.

Os miRNAs miR-340, miR-19a e miR-19b, que potencialmente alvejam NRF2 segundo nossas predições, também podem estar envolvidos na regulação de genes ativados por esse fator de transcrição. O miR-340, que comprovadamente regula NRF2 (SHI *et al.*, 2014), também possui como um de seus alvos o transportador SLC6A6, enquanto os miRNAs miR-19a e miR-19b parecem regular o gene que codifica a subunidade catalítica da glutamato-cisteína ligase (GCLC), necessária para a síntese da glutatona. Além disso, foi verificado que peróxido de hidrogênio regula negativamente a expressão de miR-19a e miR-19b em ratos, relacionando esses miRNAs a uma resposta ao estresse oxidativo (XU *et al.*, 2016; HONG *et al.*, 2017).

É interessante observar que os miRNAs que regulam os genes da via de NRF2 estão diferencialmente expressos apenas nas amostras extracelulares e de exossomos, não apresentando diferença de expressão nas amostras intracelulares. Com exceção de um miRNA, miR-769, todos estão com a expressão diminuída nos exossomos. Novamente, isso pode indicar uma tentativa das células infectadas de sinalizar as células vizinhas da importância desses genes, evitando sua repressão ou degradação. Embora isso seja apenas uma hipótese, é interessante observá-la, dado que a maioria dos miRNAs diferencialmente expressos não está nas amostras intracelulares. Enquanto que os miRNAs identificados nas amostras extracelulares totais podem conter sRNAs que reflitam restos de degradação devido à presença de RNases e mRNAs no meio extracelular e dessa forma incidam no alto número de miRNAs identificados, acreditamos que isso não aconteça nos exossomos, pois essas estruturas possuem uma membrana que protege seu conteúdo de degradação. Desse modo, deve-se considerar a diferença de expressão de miRNAs nos exossomos como relevante e é essencial especular como essas vesículas podem interferir na regulação gênica de células vizinhas. Além disso, como exossomos podem afetar também outros tipos celulares, eles podem conter miRNAs que alvejam genes que não estão diferencialmente expressos em nossas amostras.

Analisando as interações repressivas entre miRNAs e mRNAs identificamos diversos genes relacionados ao citoesqueleto e à divisão celular como alvos de miRNAs. Inclusive, foram identificados genes alvejados por diversos miRNAs e miRNAs que possuem alvos em mais de um gene com funções relacionadas. O gene *tns3*, relacionado ao citoesqueleto, foi identificado como alvo de 16 miRNAs, enquanto o miRNA prediction_1_283871940_283872004_-_5p-424-HC alveja oito genes, incluindo genes que

codificam dineínas e genes envolvidos em sua montagem. De modo geral, genes que codificam cadeias de dineínas representam 12 alvos de miRNAs, sendo que DNAL1 (*dynein axonemal light chain 1*) é alvo de sete miRNAs diferentes. No entanto, a maioria desses miRNAs representa novas predições e miRNAs identificados por Martini e colaboradores (2014), não havendo dados na literatura que possibilitem expandir a discussão. Apesar disso, esses resultados sugerem que genes com funções relacionadas ao citoesqueleto e divisão celular cuja expressão está diminuída também podem estar sendo regulados por miRNAs durante a infecção.

Comparando nossos resultados com dados da literatura de células epiteliais submetidas a infecções bacterianas, encontramos várias semelhanças e também diferenças. Assim como na infecção de células epiteliais mamárias bovinas com *Streptococcus uberis* (LAWLESS *et al.*, 2013), nossos resultados mostraram a diminuição da expressão de miR-193a durante a infecção. O mesmo foi encontrado na infecção desse tipo celular com *E. coli* e *S. aureus* (JIN *et al.*, 2014). A expressão do miR-423 também foi reduzida na infecção com as duas bactérias, bem como em nosso ensaio de infecção com *M. hyopneumoniae*. No entanto, a infecção com *E. coli* e *S. aureus* causou o aumento da expressão de miR-92a (JIN *et al.*, 2014), enquanto a expressão desse miRNA está diminuída nos exossomos em nossos resultados. A infecção de suínos com *A. pleuropneumoniae* resultou na diminuição da expressão de miR-19a e no aumento da expressão de miR-542 em pulmões infectados, assim como aconteceu em nossos resultados. No entanto, ocorreu também o aumento de expressão dos miRNAs miR-10a, miR-181a e miR-181b (PODOLSKA *et al.*, 2012), que em nossos resultados tiveram expressão diminuída. Desse modo, parece que infecções com diferentes espécies bacterianas resultam em diferentes padrões de expressão de miRNAs.

Além das análises com células epiteliais, um estudo fez a análise do soro de bovinos infectados com *M. bovis*. Esse estudo identificou o aumento da expressão do miRNA miR-24 e a redução da expressão dos miRNAs miR-92a e miR-423 (CASAS *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram observados em nossas amostras infectadas com *M. hyopneumoniae*. É interessante observar que esses miRNAs estavam diferencialmente expressos no soro, e nos nossos resultados nas amostras extracelulares e exossomos, de forma que os dois resultados refletem um perfil de miRNAs que estão sendo exportados das células.

A análise de GO dos alvos de miRNAs diferencialmente expressos identificou que genes-alvo de interações permissivas estavam associados com termos relacionados a cofator do processo metabólico e à atividade de oxidação-redução, enquanto que genes-alvo de interações repressivas foram enriquecidos em termos relacionados ao citoesqueleto. Desse modo, os termos de GO dos alvos de miRNAs diferencialmente expressos parecem estar de acordo com o que foi encontrado na análise de GO dos genes diferencialmente expressos, de forma que foi identificada uma correlação entre alguns desses termos. Essa correlação não significa que os genes diferencialmente expressos são necessariamente alvos dos miRNAs diferencialmente expressos, no entanto indica que eles estão envolvidos em funções similares. É importante ressaltar a relevância dos miRNAs encontrados nos exossomos e nas amostras extracelulares na identificação dos termos de GO enriquecidos de alvos de miRNAs, visto que apenas uma pequena parte das interações permissivas e repressivas envolvem miRNAs intracelulares (71 interações repressivas e 3 permissivas).

Devido à importância que os exossomos parecem ter na transmissão de informações durante a infecção com *M. hyopneumoniae*, principalmente através de miRNAs, tornou-se interessante analisar o efeito dessas vesículas no cultivo com a bactéria, a fim de verificar se elas interagem ou tinham algum impacto no crescimento desse patógeno. Os resultados encontrados indicam que não ocorre interação do micoplasma com os exossomos e que essas vesículas não alteram o crescimento bacteriano. No entanto, os métodos utilizados não eram muito sensíveis e talvez não tenham sido os mais adequados para analisar essa interação. Dessa forma, são necessários mais experimentos para uma conclusão definitiva acerca da interação de exossomos e *M. hyopneumoniae*.

Resumindo, os resultados obtidos nesse trabalho trazem contribuições importantes sobre a patogenicidade de *M. hyopneumoniae*, sua relação com o hospedeiro suíno e a resposta da célula epitelial a essa infecção. Os dados relativos à alteração na expressão gênica causada pela infecção com essa bactéria abrem as portas para diversas investigações sobre os efeitos que *M. hyopneumoniae* provoca após a adesão às células epiteliais e que podem estar relacionados a sua patogenicidade. A identificação da produção de peróxido de hidrogênio e do uso de mio-inositol como fonte de energia como possíveis fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* são novas contribuições significativas sobre a

patogenicidade dessa bactéria. Embora os resultados iniciais tenham indicado que a linhagem atenuada J de *M. hyopneumoniae* não produza peróxido de hidrogênio, verificamos que, quando há limitação de fontes de carbono, ocorre a produção do metabólito tóxico por essa linhagem. Durante a infecção das células suínas, essa bactéria precisa competir com as células eucarióticas por glicose e outras fontes de energia. Isso pode levá-la a consumir glicerol, produzindo peróxido de hidrogênio como subproduto, assim como ocorre quando a bactéria é cultivada em meio mínimo. A identificação do aumento da expressão de genes antioxidantes durante a infecção corrobora a produção de peróxido de hidrogênio por *M. hyopneumoniae* e implica que esse metabólito pode causar efeitos nocivos às células, que tentam combater seus efeitos. Esses resultados também podem ajudar a identificar novas formas de tratamento e combate à infecção, que ajudem a combater seus efeitos oxidativos. A redução da expressão de miRNAs que regulam genes antioxidantes reitera a necessidade dessa função durante a infecção. O indício de que diversos miRNAs estão diferencialmente expressos nos exossomos reforça o papel dessas vesículas na comunicação celular. Além disso, a diminuição da expressão de diversos genes que codificam proteínas ciliares pode ser uma explicação para um dos principais efeitos da adesão de *M. hyopneumoniae* às células suínas, a ciliostase. Genes que codificam diversas proteínas responsáveis pelo movimento ciliar mostraram expressão reduzida, e embora a ciliostase seja um efeito bem descrito de *M. hyopneumoniae*, os mecanismos que a causam ainda não foram investigados. A redução da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas ao citoesqueleto e à divisão celular também oportuniza estudos relacionados ao efeito de *M. hyopneumoniae* sobre esses aspectos. Tanto o citoesqueleto quanto o ciclo celular são impactados por diversos patógenos, e nossos resultados indicam que *M. hyopneumoniae* pode estar relacionado a esses processos, sendo pertinentes mais investigações. Sendo assim, além de novos conhecimentos sobre a virulência e a relação patógeno-hospedeiro, nossos resultados deixam perspectivas de estudo relacionadas a mecanismos de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*. Além disso, esse é o primeiro estudo que faz a análise de mudanças transcricionais de genes e miRNAs de células epiteliais suínas em resposta a infecção por *M. hyopneumoniae* através de NGS.

6. CONCLUSÕES

- As linhagens patogênicas de *M. hyopneumoniae* produzem peróxido de hidrogênio a partir do metabolismo de glicerol em condições padrão de cultivo. Além disso, a linhagem atenuada J dessa espécie produz peróxido de hidrogênio em baixas concentrações de glicose.
- A produção de peróxido de hidrogênio não é regulada em nível transcricional pela expressão do gene *glpO*, pois *M. hyopneumoniae* J transcreve esse gene nos mesmos níveis que as linhagens patogênicas dessa espécie, de forma que o gene deve ser regulado pós-transcricionalmente.
- Todas as linhagens de *M. hyopneumoniae* analisadas são capazes de captar mio-inositol do meio de cultura e utilizar esse carboidrato como fonte de energia. Também foi proposto um gene candidato para a enzima IolJ, do metabolismo de mio-inositol, previamente não identificada em *M. hyopneumoniae*.
- Foram identificados 1.283 genes e 170 miRNAs diferencialmente expressos nas células suínas da linhagem NPTr infectadas com *M. hyopneumoniae*.
- A infecção com *M. hyopneumoniae* resultou no aumento da expressão de genes relacionados à atividade de oxidação-redução nas células epiteliais suínas, em sua maioria regulados pelo fator de transcrição NRF2.
- A infecção das células epiteliais por *M. hyopneumoniae* causou a redução da expressão de diversos genes relacionados aos cílios, ao citoesqueleto e ao ciclo celular.
- A predição de alvos para os miRNAs diferencialmente expressos identificou uma correlação entre as funções dos genes alvo de miRNAs e algumas funções afetadas pelos genes diferencialmente expressos.
- A maior parte dos miRNAs diferencialmente expressos está em exossomos e em amostras extracelulares, indicando que as vesículas devem ter um papel importante na comunicação celular.

- A adição de exossomos provenientes de células suínas ao meio de cultura não alterou o crescimento de *M. hyopneumoniae* pelos métodos analisados. Além disso, não ocorreu a internalização dessas vesículas pela bactéria nas condições testadas.

7. PERSPECTIVAS

- Caracterizar a proteína glpO de *M. hyopneumoniae* e determinar sua localização celular.
- Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio por *M. hyorhinis* em baixas concentrações de glicose e por *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* em outras condições de estresse.
- Caracterizar as proteínas Fba (possível IolJ) e Fba1 de *M. hyopneumoniae* a fim de identificar o substrato de cada enzima e designar corretamente a proteína IolJ nessa bactéria, além de realizar estudos funcionais para analisar as demais proteínas da via do catabolismo de mio-inositol.
- Identificar a localização celular do fator de transcrição NRF2 em células controle e infectadas por *M. hyopneumoniae* através de microscopia confocal de fluorescência.
- Analisar a expressão de proteínas ciliares após a infecção com *M. hyopneumoniae*.
- Analisar possíveis alterações do citoesqueleto durante a infecção com *M. hyopneumoniae*, bem como a atividade de proteínas importantes na organização do citoesqueleto, como RhoA.
- Analisar o efeito da infecção com *M. hyopneumoniae* sobre o ciclo celular do hospedeiro.
- Realizar a validação experimental de novos miRNAs preditos, bem como de alvos para miRNAs de interesse.
- Analisar a interação de *M. hyopneumoniae* e exossomos por microscopia eletrônica de varredura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018, 2018.
- ADAMS, C.; PITZER, J. & MINION, F. C. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun.*, 73(11): 7784-87, 2005.
- AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W. & BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, 4: eLife05005, 2015.
- ALEKSEEVA, L.; RAULT, L.; ALMEIDA, S.; LEGEMBRE, P.; EDMOND, V.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; EVEN, S.; TAIEB, F.; ARLOT-BONNEMAINS, Y.; LE LOIR, Y. & BERKOVA, N. *Staphylococcus aureus*-Induced G2/M Phase Transition Delay in Host Epithelial Cells Increases Bacterial Infective Efficiency. *PLoS One*, 8(5): e63279, 2013.
- ALEXANDER, M.; HU, R.; RUNTSCH, M. C.; KAGELE, D.A.; MOSBRUGER, T. L.; TOLMACHOVA, T.; SEABRA, M. C.; ROUND, J. L.; WARD, D. M. & O'CONNELL, R. M. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun.*, 6: 7321, 2015.
- ALLAKER, R.P.; ZIHNI, C. & KAPAS, S. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members on the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 23(4): 289-93.
- ALURAL, B.; OZERDEM, A.; ALLMER, J.; GENÇ, K. & GENÇ, S. Lithium protects against paraquat neurotoxicity by NRF2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. *Front Cell Neurosci.*, 9: 209, 2015.
- AN, J.; LAI, J.; LEHMAN, M. L. & NELSON, C. C. miRDeep*: an integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 41(2): 727-37, 2013.
- ARSIC, N.; BENDRIS, N.; PETER, M.; BEGON-PESCIA, C.; REBOUSSOU, C.; GADÉA, G.; BOUQUIER, N.; BIBEAU, F.; LEMMERS, B. & BLANCHARD, J. M. A novel function for Cyclin A2 control of cell invasion via RhoA signaling. *J Cell Biol.*, 196(1): 147-62, 2012.
- ATHALE, J.; ULRICH, A.; MACGARVEY, N. C.; BARTZ, R. R.; WELTY-WOLF, K. E.; SULIMAN, H. B. & PIANTDOSI, C. A. Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. *Free Radic Biol Med.*, 53(8): 1584-94, 2012.
- BAI, F.; NI, B.; LIU, M.; FENG, Z.; XIONG, Q.; XIAO, S. & SHAO, G. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage *via* increasing nitric oxide production, oxidative stress and caspase-3 activation. *Vet Immunol Immunopathol.*; 155(3): 155-161, 2013.

- BAO, H.; KOMMADATH, A.; LIANG, G.; SUN, X.; ARANTES, A. S.; TUGGLE, C. K.; BEARSON, S. M.; PLASTOWN, G. S.; STOTHARD, P. & GUAN IE, L. Genome-wide whole blood microRNAome and transcriptome analyses reveal miRNA-mRNA regulated host-response to foodborne pathogen *Salmonella* infection in swine. *Sci Rep.*, 5: 12620, 2015.
- BARBOSA, J. A. F.; LABRIE, J.; BEAUDRY, F.; GAGNON, C. A. & JACQUES, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces SJPL cell cycle arrest in G2/M-phase and inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Virology*, 12: 188, 2015.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2): 281-97, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215-33, 2009.
- BASEMAN, J. B.; LANGE, M.; CRISCIMAGNA, N. L.; GIRON, J. A. & THOMAS, C. A. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb. Pathog.*, 19(2): 105-116, 1995.
- BASEMAN, J. B. & TULLY, J. G. *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg. Infect. Dis.*, 3(1): 21-32, 1997.
- BELLINGHAM, S. A.; COLEMAN, B. M. & HILL, A. F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.*, 40(21): 10937-49, 2012.
- BEREZIKOV, E.; CHUNG, W. J.; WILIS, J.; CUPPEN, E. & LAI, E. C. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell.*, 28(2): 328-36, 2007.
- BERTIN, C.; PAU-ROBLOT, C.; COURTOIS, J.; MANSO-SILVÁN, L.; THIAUCOURT, F.; TARDY, F.; LE GRAND, D.; POUMARAT, F. & GAURIVAUD, P. Characterization of free exopolysaccharides secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *PLoS One*, 8(7): e68373, 2013.
- BERTIN, C.; PAU-ROBLOT, C.; COURTOIS, J.; MANSO-SILVÁN, L.; TARDY, F.; POUMARAT, F.; CITTI, C.; SIRAND-PUGNET, P.; GAURIVAUD, P. & THIAUCOURT, F. Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Appl Environ Microbiol.*, 81(2): 676-87, 2015.
- BETEL, D.; WILSON, W.; GABOW, A.; MARKS, D. S. & SANDER, C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.*, 36(Database issue): D149-D53, 2008.
- BHATNAGAR, S.; SHINAGAWA, K.; CASTELLINO, F. J. & SCHOREY, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 110(9):3234-44, 2007.

- BHATTACHARYYA, S. N.; HABERMACHER, R.; MARTINE, U.; CLOSS, E. I. & FILIPOWICZ, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6): 1111-24, 2006.
- BISWAL, S. THIMMULAPPA, R. K. & HARVEY, C. J. Experimental therapeutics of Nrf2 as a target for prevention of bacterial exacerbations in COPD. *Proc Am Thorac Soc.*, 9(2): 47-51, 2012.
- BLANK, W. A. & STEMKE, G. W. A physical and genetic map of the *Mycoplasma flocculare* ATCC 27716 chromosome reveals large genomic inversions when compared with that of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain J (T). *Int J Syst Evol Microbiol.*, 51(Pt 4): 1395-9, 2001.
- BLOTZ, C. & STULKE, J. Glycerol metabolism and its implication in virulence in *Mycoplasma*. *FEMS Microbiol Rev.*, 41(5): 640-652, 2017.
- BOGEMA, D. R.; SCOTT, N. E.; PADULA, M. P.; TACCHI, J. L.; RAYMOND, B. B. A.; JENKINS, C.; CORDWELL, S. J.; MINION, F. C.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem.*, 286(48): 41217-29, 2011.
- BOGEMA, D. R.; DEUTSCHER, A. T.; WOOLLEY, L. K.; SEYMOUR, L. M.; RAYMOND, B. B. A.; TACCHI, J. L.; PADULA, M. P.; DIXON, N. E.; MINION, F. C.; JENKINS, C.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. Characterization of cleavage events in multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. *mBio*, 3(2): e00282-11, 2012.
- BOLANOS-GARCIA, V. M. & BLUNDELL, T. L. BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem Sci.*, 36(3): 141-50, 2011.
- BROWNING, G. F.; MARENDA, M. S.; NOORMOHAMMADI, A. H. & MARKHAM, P. F. The role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet Microbiol.*, 153(1-2): 44-50, 2011.
- BROWNING, G. F.; NOORMOHAMMADI, A. H. & MARKHAM, P. F. Identification and characterization of virulence genes in mycoplasmas. In: Browning, G. F. & Citti, C. *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. Caister Academic Press, p. 77-90, 2014.
- BURGOS, R.; PICH, O. Q.; FERRER-NAVARRO, M.; BASEMAN, J. B.; QUEROL, E. & PIÑOL, J. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development. *J Bacteriol.*, 188(24): 8627-37, 2006.
- BURNETT, T. A.; DINKLA, K.; ROHDE, M.; CHHATWAI, G. S.; UPHOFF, C.; SRIVASTAVA, M.; CORDWELL, S. J.; GEARY, S.; LIAO, X.; MINION, F. C.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol.*, 60(3): 669-86, 2006.

- CAI, S.; BATRA, S.; LIRA, S. A.; KOLLS, J. K. & JEYASEELAN, S. CXCL1 Regulates Pulmonary Host Defense to *Klebsiella* Infection via CXCL2 , CXCL5, NF- κ B and MAPKs. *J Immunol.*, 185(10): 6214-25, 2010.
- CALCUTT, M. J.; FOECKING, M. F.; ROSALES, R. S.; ELLIS, R. J. & NICHOLAS, R. A. Genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain DGL-1. *J Bacteriol.*, 194(7): 1848, 2012.
- CALCUTT, M. J.; FOECKING, M. F.; HEIDARI, M. B. & MCINTOSH, M. A. Complete genome sequence of *Mycoplasma flocculare* strain Ms42T (ATCC 27399T). *Genome Announc.*, 3(2): e00124-15, 2015.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis.*, 184(3): 337-44, 2001.
- CASAS, E.; CAI, G.; KUEHN, L. A.; REGISTER, K. B.; MCDANELD, T. G. & NEILL, J. D. Association of MicroRNAs with Antibody Response to *Mycoplasma bovis* in Beef Cattle. *PLoS One*, 11(8): e0161651, 2016.
- CASSELLIM T.; QURESHI, H.; PETERSON, E.; PERLEY, D.; BLAKE, E.; JOKINEN, B.; ABBAS, A.; NECHAEV, S.; WATT, J. A.; DHASARATHY, A. & BRISSETTE, C. A. MicroRNA and mRNA Transcriptome Profiling in Primary Human Astrocytes Infected with *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One*, 12(1): e0170961, 2017.
- CASTRO, L. A.; PEDROSO, T. R.; KUCHIISHI, S. S.; RAMENZONI, M.; KICH, J. D.; ZAHA, A.; VAINSTEIN, M. H. & FERREIRA, H. B. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Microbiol.*, 116(4): 258-69, 2006.
- CATTANI, A. M.; SIQUEIRA, F. M.; GUEDES, R. L. M. & SCHRANK, I. S. Repetitive elements in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcriptional regulation. *PLoS One*, 11(12): e0168626, 2016.
- CHE, Q.; FENG, Z.; BAI, F.; LIU, M. & GUOQING, S. Adhesion of different virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* to host cells. *Chin J PRev Vet Med.*, 35: 725-8, 2013 apud LIU, M.; GAIMEI, D.; BEIBEI, L.; HU, Y.; LIU, J.; JIA, Y.; MINION, F. C.; SHAO, G. & ZHAO, R. Cholesterol exacerbates *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced apoptosis via stimulating proliferation and adhesion to porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol.*, 211: 112-18, 2017a.
- CHEN, Y.; XU, Y.; ZHENG, H.; FU, J.; HOU, Y.; WANG, H.; ZHANG, Q.; YAMAMOTO, M. & PI, J. The role of nuclear factor E2-Related factor 2 and uncoupling protein 2 in glutathione metabolism Evidence from an in vivo gene knockout study. *Biochem Biophys Res Commun.*, 478(1): 87-92, 2016.
- CHO, H. Y.; REDDY, S. P. & KLEEBERGER, S. R. Nrf2 Defends the Lung from Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 8(1-2): 76-87, 2006.
- CHO, R. J.; HUANG, M.; CAMPBELL, M. J.; DONG, H.; STEINMETZ, L.; SAPINOSO, L.; HAMPTON, G.; ELLEDGE, S. J.; DAVIS, R. W. & LOCKHART, D. J.

Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet.*, 27(1): 48-54, 2001.

CHOI, C.; KWON, D.; JUNG, K.; HA, Y.; LEE, Y.-H.; KIM, O.; PARK, H.-K.; KIM, S.-H.; HWANG, K.-K. & CHAE, C. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Com Path.*, 134: 40-46, 2006.

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. *Can. J. Vet. Res.*, 52(4): 434-438, 1988.

CITTI, C. & BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.*, 21(4): 196-203, 2013.

CITTI, C.; WATSON-McKOWN, R.; DROESSE, M. & WISE, K. S. Gene families encoding phase- and size- variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Bacteriol.*, 182(5): 1356-63, 2000.

CITTI, C.; NOUVEL, L.-X. & BARANOWSKI, E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol.*, 5(7): 1073-85, 2010.

CLARK, J. Mycoplasmas – Identifying hosts for a stealth pathogen. *Vet. J.*, 170(3): 273-4, 2005.

COOPLE, I. M. The Keap1-Nrf2 Cell Defense Pathway – A Promising Therapeutic Target? *Adv Pharmacol.*, 63: 43-79, 2012.

CROZE, M. L. & SOULAGE, C. O. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*, 95: 1811-27, 2013.

CUI, Q. K.; LIU, W. D.; ZHU, J. X.; WANG, Y. H. & WANG, Z. G. MicroRNA-184 promotes proliferation ability of glioma cells by regulating FOXO3. *Asian Pac J Trop Med.*, 7(10): 776-9, 2014.

DABRAZHNETSKAYA, A.; SOIKA, V.; VOLOKHOV, D.; SIMONYAN, V. & CHIZHIKOV, V. Genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain DBS 1050. *Genome Announc.*, 2(2): e00127-14, 2014.

DAUBENSPECK, J. M.; BOLLAND, J. R.; LUO, W.; SIMMONS, W. L. & DYBVIG, K. Identification of exopolysaccharide-deficient mutants of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol Microbiol.*, 72(5): 1235-45, 2009.

DEBEY, M. C. & ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.*, 62(12): 5312-5318, 1994.

DEUTSCHER, A. T.; JENKINS, C.; MINION, F. C.; SEYMOUR, L. M.; PADULA, M. P.; DIXON, N. E.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Mol Microbiol.*, 78(2): 444-458, 2010.

- DEUTSCHER, A. T.; TACCHI, J. L.; MINION, F. C.; PADULA, M. P.; CROSSETT, B. BOGEMA, D. R.; JENKINS, C.; KUIT, T. A.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. *Mycoplasma hyopneumoniae* surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endorpotelytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs. *J Proteome Res.*, 11(3): 1924-36, 2012.
- DJORDJEVIC, S. P.; CORDWELL, S. J.; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J. & MINION, F. C. Proteolytic processing of *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun.*, 72(5): 2791-2802, 2004.
- DREXLER, H. G. & UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2): 75-90, 2002.
- DUVAL, M.; COSSART, P. & LEBRETON, A. Mammalian microRNAs and long noncoding RNAs in the host-bacterial pathogen crosstalk. *Semin Cell Dev Biol.*, 65: 11-19, 2016.
- DYBVIG, K. & VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 25-57, 1996.
- ELKINGTON, P. T.; O'KANE, C. M. & FRIEDLAND, J. S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol.*, 142(1): 12-20, 2005.
- EMRE, Y. & NÜBEL, T. Uncoupling protein UCP2 When mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett.*, 584(8): 1437-42, 2010.
- ERMAN, A.; LAKOTA, K.; MRAK-POLSAK, K.; BLANGO, M. G.; KRIZAN-HERGOUTH, V.; MULVEY, M. A.; SODIN-SEMRL, S. & VERANIC, P. Uropathogenic *Escherichia coli* Induces Serum Amyloid A in Mice following Urinary Tract and Systemic Inoculation. *PLoS One*, 7(3): e32933, 2012.
- EULALIO, A.; SCHULTE, L. & VOGEL, J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol.*, 9(6): 742-50, 2012.
- EVANS-OSES, I.; REICHEMBACH, L. H. & RAMIREZ, M. I. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. *Parasitol Res.*, 114(10): 3567-75, 2015.
- FENG, J.; MEYER, C. A.; WANG, Q.; LIU, J. S.; SHIRLEY LIU, X. & ZHANG, Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 28(21): 2782-8, 2012.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, A.; KOUREMBANAS, S.; WYATT, T. A. & MITSIALIS, S. A. Mutation of Murine Adenylate Kinase 7 Underlies a Primary Ciliary Dyskinesia Phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 40(3): 305-13, 2009.
- FERRARI, M.; SCALVINI, A.; LOSIO, M. N.; CORRADI, A.; SONCINI, M.; BIGNOTTI, E.; MILANESI, E.; AJMONE-MARSAN, P.; BARLATI, S.; BELLOTTI, D. & TONELLI, M. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J Virol Methods*, 107(2): 205-12, 2003.

- FERRARINI, M. G.; SIQUEIRA, F. M.; MUCHA, S. G.; PALAMA, T. L.; JOBARD, E.; ELENA-HERRMANN, B.; VASCONCELOS, A. T. R.; TARDY, F.; SCHRANK, I. S.; ZAHA, A. & SAGOT, M.-F. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics*, 17: 353, 2016.
- FERREIRA, H. B. & CASTRO, L. A. A preliminar survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genet Mol Biol.*, 30(1): 245-255, 2007.
- FLITMAN-TENE, R.; MUDAHI-ORENSTEIN, S.; LEVISOHN, S. & YOGEV, D. Variable lipoprotein genes of *Mycoplasma agalactiae* are activated *in vivo* by promoter addition via site-specific DNA inversions. *Infect Immun.*, 71(7): 3821-30, 2003.
- FORTERRE, A. JALABERT, A.; CHIKH, K.; PESENTI, S.; EUTHINE, V.; GRANJON, A.; ERRAZURIZ, E.; LEFAI, E.; VIDAL, H. & ROME, S. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle*, 13(1): 78-89, 2014.
- FOURQUET, S.; GUEROIS, R.; BIARD, D. & TOLEDANO, M. B. Activation of NRF2 by Nitrosative Agents and H₂O₂ Involves KEAP1 Disulfide Formation. *J Biol Chem.*, 285(11): 8463-71, 2010.
- FRANCO, I. S. & SHUMAN, H. A. A pathogen's journey in the host cell. *Bioarchitecture*, 2(2): 38-42, 2012.
- FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERVALAGE, 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
- FREEMAN, M. J.; ARMSTRONG, C. H.; SANDS-FREEMAN, L. L. & LOPEZ-OSUNA, M. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinitis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemmagglutination tests. *Can J. Com Med.*, 48: 202-207, 1984.
- FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.; BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*, 19(1): 92-105, 2009.
- FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord. Vet. Med.*, 27(6): 337-339, 1975.
- FRIIS, N. F. & FEENSTRA, A. A. *Mycoplasma hyorhinitis* in the etiology of serositis among piglets. *Acta. Vet. Scand.*, 35: 93-98, 1994.
- FRITSCH, T. E.; SIQUEIRA, F. M. & SCHRANK, I. S. Intrinsic terminators in *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription. *BMC Genomics*, 16: 273, 2015.

- FUNG, T. K.; MA, H. T. & POON, R. Y. Specialized Roles of the Two Mitotic Cyclins in Somatic Cells: Cyclin A as an Activator of M Phase-promoting Factor. *Mol Biol Cell.*, 18(5): 1861-73, 2007.
- GAO, A. M.; ZHANG, X. Y. & KE, Z. P. Apigenin sensitizes BEL-7402/ADM cells to doxorubicin through inhibiting miR-101/Nrf2 pathway. *Oncotarget*, 8(47): 82085-82091, 2017.
- GARCIA-MORANTE, B.; DORS, A.; LEÓN-KEMPIS, R.; PÉREZ DE ROZAS, A.; SEGALÉS, J. & SIBILA, M. Assessment of the *in vitro* growing dynamics and kinetics of the non-pathogenic J and pathogenic 11 and 232 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Res.*, 49(1): 45, 2018.
- GAURIVAUD, P.; LAKHDAR, L.; LE GRAND, D.; POUMARAT, F. & TARDY, F. Comparison on *in vivo* and *in vitro* properties of capsulated and noncapsulated variants of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* strain Afadé: a potential new insight of contagious bovine pleuropneumonia. *FEMS Microbiol Lett.*, 359(1): 42-9, 2014.
- GAURIVAUD, P.; BARANOWSKI, E.; PAU-ROBLOT, C.; SAGNÉ, E.; CITTI, C. & TARDY, F. *Mycoplasma agalactiae* secretion of β -(1-6)-Glucan, a rare polysaccharide in prokaryotes, is governed by high-frequency phase variation. *Appl Environ Microbiol.*, 82(11): 3370-3383, 2016.
- GIBSON, D. G.; BENDERS, G. A.; ANDREWS-PFENKCOCH, C.; DENISOVA, E. A.; BADEN-TILLSON, H.; ZAVERI, J.; STOCKWELL, T. B.; BROWNLEY, A.; THOMAS, D. W.; ALGIRE, M. A.; MERRYMAN, C.; YOUNG, L.; NOSKOV, V. N.; GLASS, J.I.; VENTER, C.; HUTCHISON III, C. A. & SMITH, O. Complete chemical synthesis, assembly and cloning of *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 319(5867): 1215-1220, 2008.
- GIBSON, D. G.; GLASS, J. I.; LARTIGUE, C.; NOSKOV, V. N.; CHUANG, R. Y.; ALGIRE, M. A.; BENDERS, G. A.; MONTAGUE, M. G.; MA, L.; MOONDIE, M. M.; MERRYMAN, C.; VASHEE, S.; KRISHNAKUMAR, R.; ASSAD-GARCIA, N.; ANDREWS-PFENKCOCH, C.; DENISOVA, E. A.; YOUNG, L.; QI, Z. Q.; SEGALL-SHAPIRO, T. H.; CALVEY, C. H.; PARMAR, P. P.; HUTCHISON III, C. A.; SMITH, O. & VENTER, C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329(5986): 52-56, 2010.
- GIRON, J. A.; LANGE, M. & BASEMAN, J. B. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun.*, 64(1): 197-2008, 1996.
- GLASS, J. I.; ASSAD-GARCIA, N.; ALPEROVICH, N.; YOOSEPH, S.; LEWIS, M. R.; MARUF, M.; HUTCHISON III, C. A.; SMITH, H. O. & VENTER, J. C. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(2): 425-430, 2006.
- GLEW, M. D.; BASEGGIO, N.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F. & WALKER, I. D. Expression of the pMGA Genes of *Mycoplasma gallisepticum* is Controlled by Variation in the GAA Trinucleotide Repeat Lengths within the 5' Noncoding Regions. *Infect Immun.*, 66(12): 5833-41, 1998.

- GOIS, M.; VALICEK, L. & SOVADINA, M. *Mycoplasma hyorhinis*, a causative agent of pneumonia. Zentralbl Veterinarmed B., 15(2): 230-40, 1968.
- GOIS, M.; POSPISIL, Z.; CERNY, M. & MRVA, V. Production of pneumonia after intranasal inoculation of gnotobiotic piglets with three strains of *Mycoplasma hyorhinis*. J Comp Pathol., 81(3): 401-10, 1971.
- GOMERSALL, A. C.; PHAN, H. A.; IACUONE, S.; LI, S. F. & PARISH, R. W. The *Mycoplasma hyorhinis* p37 protein rapidly induces genes in fibroblasts associated with inflammation and cancer. PLoS One, 10(10): e0140753, 2015.
- GOMEZ, J. C.; DANG, H.; MARTIN, J. R. & DOERSCHUK, C. M. Nrf2 Modulates Host Defense during Streptococcus pneumoniae Pneumonia in Mice. J Immunol., 197(7): 2864-79, 2016.
- GONG, M.; MENG, L.; JIANG, B.; ZHANG, J.; YANG, H.; WU, J. & SHOU, C. P37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. Mol Cancer Ther., 7(3), 2008.
- GOODISON, S.; URQUIDI, V.; KUMAR, D.; REYES, L. & ROSSER, C. J. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain SK76. Genome Announc., 1(1): e00101-12, 2013.
- GOODWIN, R. F. W.; POMEROY, A. P. & WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumonia in pigs with a *Mycoplasma*. Vet. Rec., 77: 1247-1249, 1965.
- GRAHAM, G. J. D6 and the atypical chemokine receptor family novel regulators of immune and inflammatory processes. Eur J Immunol., 39(2): 342-51, 2009.
- GREENBERGER, M. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; DANFORTH, J. M.; LAICHALK, L. L.; MCGILLICUDDY, D. C. & STANDIFORD, T. J. Neutralization of Macrophage Inflammatory Protein-2 Attenuates Neutrophil Recruitment and Bacterial Clearance in Murine *Klebsiella* Pneumonia. J Infect Dis., 173(1): 159-65, 1996.
- GROBHENNIG, S.; ISCHEBECK, T.; GIBHARDT, J.; BUSSE, J.; FEUSSNER, I. & STULKE, J. Hydrogen sulfide is a novel potential virulence factor of *Mycoplasma pneumoniae*: characterization of the unusual cysteine desulfurase/desulphydrase HapE. Mol Microbiol., 100(1): 42-54, 2016.
- GÜELL, M.; NOORT, V.; YUS, E.; CHEN, W.-H.; 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.
- HACKENBERG, M.; STURM, M.; LANGENBERGER, D.; FALCÓN-PÉREZ, J. M.; ARANSAY, A. M. miRanalyzer a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. Nuclei Acids Res., 37(Web Server issue): W68-76, 2009.

- HAKKARAINEN, K.; TURUNEN, H.; MIETTINEN, A.; KARPPILIN, M.; KAITILA, K. & JANSSON, E. Mycoplasmas and arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 51(10): 1170-2, 1992.
- HALBEDEL, S. & STULKE, J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297(1): 37-44, 2007.
- HAMES, C.; HALBEDEL, S.; SCHILLING, O. & STULKE, J. MMR: A method for the simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7): 4097-4100, 2005.
- HAMES, C.; HALBEDEL, S.; HOPPERT, M.; FREY, J. & STULKE, J. Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol.*, 191(3): 747-753, 2009.
- HAN, J.; PARK, B.-S.; SHIN, D.-J.; SONG, S.-Y.; JEONG, Y.-J & LEE, N. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain KM014, a clinical isolate from South Korea. *Genome Announc.*, 5(38): e01012-17, 2017.
- HASEGAWA, S.; NAGANO, H.; KONNO, M.; EGUCHI, H.; TOMOKUNI, A.; TOMIMARU, Y.; WADA, H.; HAMA, N.; KAWAMOTO, K.; KOBAYASHI, S.; MARUBASHI, S.; NISHIDA, N.; KOSEKI, J.; GOTOH, N.; OHNO, S.; YABUTA, N.; NOJIMA, H.; MORI, M.; DOKI, Y. & ISHII, H. Cyclin G2: A novel independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncol Lett.*, 10(5): 2986-2990, 2015.
- HEGAN, P. S.; OSTERTAG, E.; GEURTS, A. M. & MOOSEKER, M. S. Myosin Id is required for planar cell polarity in ciliated tracheal and ependymal epithelial cells. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 72(10): 503-16, 2015.
- HENG, Y. W. & KOH, C. G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol.*, 42(10): 1622-33, 2010.
- HERTZBERGER, R.; ARENTS, J.; DEKKER, H. L.; PRIDMORE, R. D.; GYSLER, C.; KLEEREBEZEM, M. & DE MATTOS, M. J. H₂O₂ Production in Species of the *Lactobacillus acidophilus* Group: a Central Role for a Novel NADH-Dependent Flavin Reductase. *Appl Environ Microbiol.*, 80(7): 2229-39, 2014.
- HIELPOS, M. S.; FERRERO, M. C.; FERNÁNDEZ, A. G.; BONETTO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; FOSSATI, C. A. & BALDI, P. C. CCL20 and Beta-Defensin 2 Production by Human Lung Epithelial Cells and Macrophages in Response to *Brucella abortus* Infection. *PLoS One*, 10(10): e0140408, 2015.
- HIGASHI, S.; FOURNIER, C.; GAUTIER, C.; GASPIN, C.; SAGOT, M. F. Mirinho: An efficient and general plant and animal pre-miRNA predictor for genomic and deep sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 16: 179, 2015.
- HONG, J.; WANG, Y., HU, B. C.; XU, L.; LIU, J. Q.; CHEN, M. H.; WANG, J. Z.; HAN, F.; ZHENG, Y.; CHEN, X.; LI, Q.; YANG, X. H.; SUN, R. H. & MO, S. J. Transcriptional downregulation of microRNA-19a by ROS production and NF-κB deactivation governs resistance to oxidative stress-initiated apoptosis. *Oncotarget*, 8(41): 70967-70981, 2017.
- HSU, T. & MINION, F. C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun.*, 66(10): 4762-6, 1998.

- HUNT, M. E. & BROWN, D. R. Role of sialidase in *Mycoplasma alligatoris*-induced pulmonary fibroblast apoptosis. *Vet Microbiol.*, 121(1-2): 73-82, 2007.
- HUTCHISON, C. A. III; PETERSON S. N.; GILL, R. S.; CLINE, R. T.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; SMITH, H. O. & VENTER, J. C. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, 286(5447):2165–2169, 1999.
- HUTCHISON, C. A. III; CHUANG, R.-Y.; NOSKOV, V. N.; ASSAD-GARCIA, N.; DEERINCK, T. J.; ELLISMAN, M. H.; GILL, J. KANNAN, K.; KARAS, B. J.; MA, L.; PELLETIER, J. F.; QI, Z.-Q.; RICHTER, R. A.; STRYCHALSKI, E. A.; SUN, L.; SUZUKI, Y.; TSVETANOVA, B.; WISE, K. S.; SMITH, H. O.; GLASS, J. I.; MERRYMAN, C.; GIBSON, D. G. & VENTER, J. C. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, 351(6280): aad6253, 2016.
- HWANG, J. M., LEE, J. H. & YEH, J. Y. A multi-laboratory profile of *Mycoplasma* contamination in *Lawsonia intracellularis* cultures. *BMC Res Notes.*, 5:78, 2012.
- IBAÑEZ-TALLON, I.; HEINTZ, N. & OMRAN, H. To beat or not to beat roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet.*, 12: R27-35, 2003.
- INABA, Y.; SHINOHARA, K.; BOTILDE, Y.; NABESHIMA, R.; TAKAOKA, K.; AJIMA, R.; LAMRI, L.; TAKEDA, H.; SAGA, Y.; NAKAMURA, T. & HAMADA, H. Transport of the outer dynein arm complex to cilia requires a cytoplasmic protein Lrrc6. *Genes Cells*, 21(7): 728-39, 2016.
- JANEWAY, C. A. JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *et al.* Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; The complement system and innate immunity, 2001 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>
- JELENSKA, J.; KANG, Y. & GREENBERGM J. T. Plant pathogenic bacteria target the actin microfilament network involved in the trafficking of disease defense components. *Bioarchitecture*, 4(4-5): 149-53, 2014.
- JENKINS, C.; WILTON, J. L.; MINION, F. C.; FALCONER, L.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun.*, 74(1): 481-7, 2006.
- JIANG, W.; QIAN, L.; LIANG, H.; TIAN, M.; LIU, F. & ZHAO, D. Relationships between the varied ciliated respiratory epithelium abnormalities and severity of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Scand J Infect Dis.*, 46(7): 486-92, 2014.
- JIN, W.; IBEAGHA-AWEMU, E. M.; LIANG, G.; BEAUDOIN, F.; ZHAO, X. & GUAN IE, L. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics*, 15: 181, 2014.
- JONES, A.; JONSSON, A. B. & ARO, H. *Neisseria gonorrhoeae* infection causes a G1 arrest in human epithelial cells. *FASEB J.*, 21(2): 345-55, 2007.
- KAMMINGA, T.; KOEHORST, J. J.; VERMEIJ, P.; SLAGMAN, S.-J.; DOS SANTOS, V. A. P. M.; BIJLSMA, J. J. E. & SCHAAP, P. J. Persistence of functional protein

domains in mycoplasma species and their role in host specificity and synthetic minimal life. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7:31, 2017.

KANG, M. I.; KOBAYASHI, A.; WAKABAYASHI, N.; KIM, S. G. & YAMAMOTO, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(7): 2046-51, 2004.

KANNAN, T. R. & BASEMAN, J. B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103(17): 6724-9, 2006.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N. & BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 47: 89-116, 2007.

KERTESZ, M.; IOVINO, N.; UNNERSTALL, U.; GAUL, U.; SEGAL, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet.*, 39(10): 1278-84, 2007.

KHAN, L. A.; MILES, R. J. & NICHOLAS, R. A. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂. *Vet Res Commun.*, 29(3): 181-8, 2005.

KIM, Y. H.; YEOL CHOI, J.; JEONG, Y.; WOLGEMUTH, D. J. & RHEE, K. Nek2 localizes to multiple sites in mitotic cells, suggesting its involvement in multiple cellular functions during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun.*, 290(2): 730-6, 2002.

KIM, V. N. & NAM, J. W. Genomics of microRNA. *Trends Genet.*, 22(3): 165-73, 2006.

KING, S. M. Axonemal Dynein Arms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 8(11): a028100, 2016.

KOBAYASHI, D. & TAKEDA, H. Ciliary motility the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation*, 83(2): S23-9, 2012.

KOBISH, M. & FRIIS, N. F. Swine mycoplasmoses. *Rev Off Int Epizoot.*, 15: 1569-1605, 1996.

KOHLER, P. R.; ZHENG, J. Y.; SCHOFFERS, E. & ROSSBACH, S. Inositol catabolism, a key pathway in *Sinorhizobium meliloti* for competitive host nodulation. *Appl Environ Microbiol.*, 76(24): 7972-80, 2010.

KORNSPAN, J. D.; LYSNYANSKY, I.; KAHAN, T.; HERRMANN, R.; ROTTEM, S. & NIR-PAZ, R. Genome analysis of a *Mycoplasma hyorhinis* strain derived from a primary human melanoma cell line. *J Bacteriol.*, 193(17): 4543-4, 2011.

KOZOMARA, A. & GRIFFITHS-JONES, S. miRBase annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 42(Database issue): D68-73, 2014.

- KRAUSE, D. C. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. Trends Microbiol., 6(1): 15-8, 1998.
- KROGER, C. & FUCHS, T. M. Characterization of the myo-inositol utilization island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol., 191(2): 545-54, 2009.
- KUSHNER, I. The phenomenon of the acute phase response. Ann N Y Acad Sci., 389: 39-48, 1982.
- LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L. & GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. Physiol Rev., 94(3): 739-77, 2014.
- LAWLESS, N.; FOROUSHANI, A. B.; MCCABE, M. S.; O'FARRELLY, C. & LYNN, D. J. Next Generation Sequencing Reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection. PLoS One, 8(3): e57543, 2013.
- LE CARROU, J.; LAURENTIE, M.; KOBISH, M. & GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs after Marbofloxacin Treatment and Detection of Mutations in the *parC* Gene. Antimicrob Agents Chemother., 50(6), 1959-66, 2006.
- LEAL, F. M. A.; PALUDO, G. P.; MOURA, H.; BARR, J. R. & FERREIRA, H. B. Secretome profiling of swine tracheal cell line infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448, *Mycoplasma hyopneumoniae* J and *Mycoplasma flocculare* reveals both host and bacterial PEP determinants. Submetido à publicação, 2018.
- LEE, H. M.; KIM, T. S. & JO, E. K. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. BMB Rep., 49(6): 311-8, 2016.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. *the C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 75(5): 843-54, 1993.
- LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S. & KIM, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 425(6956): 415-9, 2003.
- LEWIS, B. P.; SHIH, I. H.; JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P. & BURGE, C. B. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell, 115(7): 787-98, 2003.
- LI, Y. Z.; HO, Y. P.; CHEN, S. T.; CHIOU, T. W.; LI, Z. S. & SHIUAN, D. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Biochemistry (Mosc), 74: 215-220, 2009.
- LIANG, H.; JIANG, W.; HAN, Q.; LIU, F. & ZHAO, D. Ciliary ultrastructural abnormalities in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in 22 pediatric patients. Eur J Pediatric., 171(3): 559-63, 2012.
- LIANG, W.; GUAN, H.; HE, X.; KE, W.; XU, L.; LIU, L.; XIAO, H. & LI, Y. Down-regulation of SOSTDC1 promotes thyroid cancer cell proliferation via regulating cyclin A2 and cyclin E2. Oncotarget, 6(31): 31780-91, 2015.

- LIM, L. P.; LAU, N. C.; WEISTEIN, E. G.; ABDELHAKIM, A.; YEKTA, S.; RHOADES, M. W.; BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.*, 17(8): 991-1008, 2003.
- LIM, L. P.; LAU, N. C.; GARRET-ENGELE, P.; GRIMSON, A.; SCHELTER, J. M.; CASTLE, J.; BARTEL, D. P.; LINSLEY, P. S. & JOHNSON, J. M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027): 769-73, 2005.
- LIN, J. H.; CHEN, S. P.; YEH, K. S. & WENG, C. N. *Mycoplasma hyorhinitis* in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet Microbiol.*, 115(1-3): 111-6, 2006.
- LIU, W.; FANG, L.; LI, S.; LI, Q.; ZHOU, Z.; FENG, Z.; LUO, R.; SHAO, G.; WANG, L.; CHEN, H. & XIAO, S. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinitis* strain HUB-1. *J Bacteriol.*, 192(21): 5844-5, 2010.
- LIU, W.; FENG, Z.; FANG, L.; ZHOU, Z.; LI, Q.; LI, S.; LUO, R.; WANG, L.; CHEN, H.; SHAO, G. & XIAO, S. Complete sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J. Bacteriol.*, 193(4): 1016-1017, 2011.
- LIU, B.; LI, J. & CAIRNS, M. J. Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform.*, 15(1): 1-19, 2012.
- LIU, W.; XIAO, S.; LI, M.; GUO, S.; LI, S.; LUO, R.; FENG, Z.; LI, B.; ZHOU, Z.; SHAO, G.; CHENG, H. & FANG, L. Comparative genomic analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics*, 14: 80, 2013.
- LIU, S.; DA CUNHA, A. P.; REZENDE, R. M.; CIALIC, R.; WEI, Z.; BRY, L.; COMSTOCK, L. E.; GANDHI, R. & WEINER, H. L. The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA. *Cell Host Microbe.*, 19(1): 32-43, 2016.
- LIU, M.; GAIMEI, D.; BEIBEI, L.; HU, Y.; LIU, J.; JIA, Y.; MINION, F. C.; SHAO, G. & ZHAO, R. Cholesterol exacerbates *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced apoptosis via stimulating proliferation and adhesion to porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol.*, 211: 112-18, 2017a.
- LIUM H.; WU, H. Y.; WANG, W. Y.; ZHAO, Z. L.; LIU, X. Y. & WANG, L. Y. Regulation of miR-92a on vascular endothelial aging via mediating Nrf2-KEAP1-ARE signal pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 21(11): 2734-2742, 2017b.
- LLUCH-SENAR, M.; DELGADO, J.; CHEN, W.-H.; LLORÉNS-RICO, V.; O'REILLY, F. J.; WODKE, J. A.; UNAL, E. B.; YUS, E.; MARTINEZ, S.; NICHOLS, R. J.; FERRAR, T.; VIVANCOS, A.; SCHMEISKY, A.; STÜLKE, J.; VAN NOORT, V.; GAVIN, A.-C.; BORK, P. & SERRANO, L. Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol.*, 11(1): 780, 2015.
- LO, S. C.; HAYES, M. M.; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; WEAR, D. J.; NEWTON, P. B., III; TULLY, J. G. & SHIH, J. W. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by

- Mycoplasma penetrans*: a newly isolated Mycoplasma from patients with AIDS. *Mod. Pathol.*, 6(3): 276-280, 1993.
- LOOS, M. & BRUNNER, H. Complement components (C1, C2, C3, C4) in bronchial secretions after intranasal infection of guinea pigs with *Mycoplasma pneumoniae* dissociation of unspecific and specific defense mechanisms. *Infect Immun.*, 25(2): 583-5, 1979.
- LOVE, M. I.; HUBER, W. & ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15(12): 550, 2014.
- LU, J. & HOLMGRE, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biol Med.*, 66: 75-87, 2014.
- LUO, Y.; WANG, P.; WANG, X.; WANG, Y.; MU, Z.; LI, Q.; FU, Y.; XIAO, J.; LI, G.; MA, Y.; GU, Y.; JIN, L.; MA, J.; TANG, Q.; JIANG, A.; LI, X. & LI, M. Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs. *Sci Rep.*, 7(1): 645, 2017.
- LYSNYANSKY, I.; RON, Y. & YOGEV, D. Juxtaposition of an active promoter to *vsp* genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. *J Bacteriol.*, 183(19): 5698:708, 2001.
- LYTLE, J. R.; YARIO, T. A. & STEITZ, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(23): 9667-72, 2007.
- MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 53: 401-26, 2013.
- MA, X.; YOU, X.; ZENG, Y.; HE, J.; LIU, L.; DENG, Z.; JIANG, C.; WU, H.; ZHU, C.; YU, M. & WU, Y. *Mycoplasma fermentans* MALP-2 induces heme oxygenase-1 expression via mitogen-activated protein kinases and Nrf2 pathways to modulate cyclooxygenase 2 expression in human monocytes. *Clin Vaccine Immunol.*, 20(6): 827-34, 2013.
- MAAS, S. L. N.; BREAKFIELD, X. O. & WEAVER, A. M. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.*, 27(3): 172-188, 2017.
- MACIESWSKI, B. A.; JANIESON, K. C.; ARNASON, J. W.; KOOL, C.; WIEHLER, S.; TRAVES, S. L.; LEIGH, R. & PROUD, D. Rhinovirus-bacteria coexposure synergistically induces CCL20 production from human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 312(5): L731-L740, 2017.
- MACINO, G.; CORUZZI, G.; NOBREGA, F.G.; LI, M. & TZAGOLOFF, A. Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76(8): 3784-3785, 1979.
- MACK, G. J. & COMPTON, D. A. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(25): 14434-9, 2001.

- MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L.; EDWARDS, R. & MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect. Immun.*, 74(1): 160-166, 2006a.
- MADSEN, M. L.; NETTLETON, D.; THACKER, E. L. & MINION, F. C. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology*, 152(Pt 4): 937-944, 2006b.
- MADSEN, M. L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E. L.; CARRUTHERS, M. D. & MINION, F. C. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect. Immun.*, 76(2): 658-663, 2008.
- MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M. & HAESEBROUK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.*, 126(4): 297-309, 2008.
- MAES, D.; SIBILA, M.; KUHNERT, P.; SEGALÉS, J.; HAESEBROUCK, F. & PIETERS, M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis.*, 65(Suppl. 1): 110-124, 2017.
- MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H. & KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Quart.*, 18(3): 104-109, 1996.
- MAJUMDER, S.; ZAPPULA, F. & SILBART, L. K. *Mycoplasma gallisepticum* Lipid Associated Membrane Proteins Up-regulate Inflammatory Genes in Chicken Tracheal Epithelial Cells via TLR-2 Ligation through an NF- κ B Dependent Pathway. *PLoS One*, 9(11): e112796, 2014.
- MANSKE, C.; SCHELL, U. & HILBI, H. Metabolism of myo-Inositol by *Legionella pneumophila* Promotes Infection of Amoebae and Macrophages. *Appl Environ Microbiol.*, 82(16): 5000-14, 2016.
- MARCHÈS, O.; LEDGER, T. N.; BOURY, M.; OHARA, M.; TU, X.; GOFFAUX, T.; MAINIL, J.; ROSENSHINE, I.; SUGAI, M.; DE RYCKE, J. & OSWALD, E. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol.*, 50(5): 1553-67, 2003.
- MARCILLA, A.; TRELIS, M.; CORTÉS, A.; SOTILLO, J.; CANTALAPIEDRA, F.; MINGUEZ, M. T.; VALERO, M. L.; SÁNCHEZ DEL PINO, M. M.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; TOLEDO, R. & BERNAL, D. Extracellular Vesicles from Parasitic Helminths Contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*, 7(9): e45974, 2012.
- MARÉ, C. J. & SWITZER, W. P. *Vet Med Small Anim Clin.*, 60: 841-846, 1965.
- MARTINI, P.; SALES, G.; BRUGIOLO, M.; GANDAGLIA, A.; NASO, F.; DE PITTÀ, C.; SPINA, M.; GEROSNA, G.; CHEMELLO, F.; ROMUALDI, C.; CAGNIN, S. & LANFRANCHI, G. Tissue-Specific Expression and Regulatory Networks of Pig MicroRNAome. *PLoS One*, 9(4): e89755, 2014.

- MATSON, D. R. & STUKENBERG, P. T. CENP-I and Aurora B act as a molecular switch that ties RZZ/Mad1 recruitment to kinetochore attachment status. *J Cell Biol.*, 205(4): 541-54, 2014.
- MAUDET, C.; MANO, M. & EULALIO, A. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Lett.*, 588(22):4140-7, 2014.
- MAY, M.; KLEVEN, S. H. & BROWN, D. R. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, 51(4): 829-33, 2007.
- MAY-SIMERA, H. L.; GUMERSON, J. D.; GAO, C.; CAMPOS, M.; COLOGNA, S. M.; BEYER, T.; BOLDT, K.; KAYA, K. D.; PATEL, N.; KRETSCHMER, F.; KELLEY, M. W.; PETRALIA, R.S.; DAVEY, M. G. & LI, T. Loss of Macf1 abolishes ciliogenesis and disrupts apicobasal polarity establishment in the retina. *Cell Rep.*, 17(5): 1399-1413, 2016.
- MEYLING, A. & FRIIS, N. F. Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*. *Acta Vet Scand.*, 13(2): 287-9, 1972.
- MILARA, J.; ARMENGOT, M.; MATA, M.; MORCILLO, E. J. & CORTIJO, L. Role of adenylate kinase type 7 expression on cilia motility possible link in primary ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy*, 24(3): 181-5, 2010.
- MINION, F. C.; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M. & MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J. Bacteriol.*, 186(21):7123-33, 2004.
- MONERI, S. N. C. & KIM, K. Pathogens hijack the epogenome: a new twist on host-pathogen interactions. *Am J Pathol.*, 184(4): 897-911, 2014.
- MORITA, T.; FUKUDA, H.; AWAKURA, T.; SHIMADA, A.; UMEMURA, T.; KAZAMA, S. & YAGIHASHI, T. Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. *Vet Pathol.*, 32: 107-111, 1995.
- MUNETTA, Y.; MINAGAWA, Y.; SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; HIKONO, H. & MORI, Y. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Vet Med Sci.*, 70(10): 1065-70.
- MUSATOVOVA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. & BASEMAN, J. B. Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, *Mycoplasma genitalium*. *J. Bacteriol.*, 188(8): 2845-2855, 2006.
- MUXEL, S. M.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R. A. & FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-271 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci Rep.*, 7: 44141, 2017.
- MYSLINSKI, E.; GÉRARD, M. A.; KROL, A. & CARBON, P. Transcription of the human cell cycle regulated BUB1B gene requires hStaf/ZNF143. *Nucleic Acids Res.*, 35(10): 3453-64, 2007.
- NAMIKI, K.; GOODISON, S.; PORVANSNIK, S.; ALLAN, R. W.; ICZKOWSKI, K. A.; URBANEK, C.; REYES, L.; SAKAMOTO, N. & ROSSER, C. J. Persistent exposure to

- Mycoplasma* induces malignant transformation of human prostate cells. PLoS One, 4(9): e6872, 2009.
- NATHUES, H.; FOURNIE, G.; WIELAND, B.; PFEIFFER, D. U. & STÄRK, D.C. Modeling the within-herd transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in closed pig herds. Porcine Health Manag. 2:10, 2016.
- NAVARRO, L.; DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINNET, O. & JONES, J. D. A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. Science, 312(5772): 436-9, 2006.
- NI, B.; BAI, F. F.; WEI, Y.; LIU, M. J.; FENG, Z. X.; XIONG, Q. Y.; HUA, L. Z. & SHAO, G. Q. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. Genet Mol Res., 14(3): 11429-43, 2015.
- NILSEN, T. W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. Trends Genet., 23(5): 243-9, 2007.
- NISHIASHI, A.; HARAGUSHI, T.; HIRAOKA, Y.; IKEMURA, T.; REGNIER, V.; DODSON, H.; EARNSHAW, W. C. & FUKAGAWA, T. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. Dev Cell., 2(4): 463-76, 2002.
- NOLTE-T'HOEN, E. N.; BUERMANS, H. P.; WAASDORP, M.; STOORVOGEL, W.; WAUBEN, M. H. & 'T HOEN, P. A. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. Nucleic Acids Res., 40(18): 9272-85, 2012.
- NONNEMAN, D. J.; WISE, T. H.; FORD, J. J.; KUEHN, L. A. & ROHRER, G. A. Characterization of the aldo-keto reductase 1C gene cluster on pig chromosome 10 possible associations with reproductive traits. BMC Vet Res., 2: 28, 2006.
- OKAHASHI, N.; NAKATA, M.; SUMITOMO, T.; TERAOKA, Y. & KAWABATA, S. Hydrogen Peroxide Produced by Oral Streptococci Induces Macrophage Cell Death. PLoS One, 8(5): e62563, 2013.
- OLSEN, H. G.; SKOVGAARD, K.; NIELSEN, O. L.; LEIFSSON, P. S.; JENSEN, H. E.; IBURG, T. & HEEGAARD, P. M. Organization and Biology of the Porcine Serum Amyloid A (SAA) Gene Cluster: Isoform Specific Responses to Bacterial Infection. PLoS One, 8(10): e76695, 2013.
- ONEAL, M. J.; SCHAFER, E. R.; MADSEN, M. L. & MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. Microbiology, 154(Pt 9): 2581-2588, 2008.
- ORANG, A. V.; SAFARALIDEH, R. & KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. Int J Genomics, 2014: 970607, 2014.
- OROM, U. A.; NIELSEN, F. C. & LUND, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell., 30(4): 460-71, 2008.

- OVERESCH, G. & KUHNERT, P. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* sequence types in spite of a control program for enzootic pneumonia in pigs. *Prev Vet Med.*, 145: 67-72, 2017.
- PAES, J. A.; LORENZATTO, K. R.; DE MORAES, S. N.; MOURA, H.; BARR, J. R. & FERREIRA, H. B. Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis. *J Proteomics*, 154: 69-77, 2016.
- PAES, J. A.; VIRGINIO, V. G.; CANCELA, M.; LEAL, F. M. A.; BORGES, T. J.; JAEGER, N.; BONOMIRO, C.; SCHRANK, I. S. & FERREIRA, H. B. Pro-apoptotic effect of a *Mycoplasma hyopneumoniae* putative type I signal peptidase on PK(15) swine cells. *Vet Microbiol.*, 201: 170-176, 2017.
- PALZER, A.; RITZMANN, M.; WOLF, G. & HEINRITZI, K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec.*, 162(9): 267-71, 2008.
- PAROLINI, I.; FERERICI, C.; RAGGI, C.; LUGINI, L.; PALLESCI, S.; DE MILITO, A.; COSCIA, C.; IESSI, E.; LOGOZZI, M.; MOLINARI, A.; COLONE, M.; TATTI, M.; SARGIACOMO, M. & FAIS, S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem.*, 284(49): 34211-22, 2009.
- PAULEY, K. M. & CHAN, E. K. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci.*, 1143: 226-39, 2008.
- PENDARVIS, K.; PADULA, M. P.; TACCHI, J. L.; PETERSEN, A. C.; DJORDJEVIC, S. P.; BURGESS, S. C. & MINION, F. C. Proteogenomic mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* virulent strain 232. *BMC Genomics*, 15: 576, 2014.
- PETERSEN, C. A.; ONEAL, D. C.; SEIBEL, J. R.; POEL, K.; DAUM, C. L.; DJORDJEVIC, S. P. & MINION, F. C. Cross reactivity among the swine mycoplasmas as identified by protein microarray. *Vet Microbiol.*, 192: 204-212, 2016.
- PETHŐ, A.; CHEN, Y. & GEORGE, A. Exosomes in Extracellular Matrix Bone Biology. *Curr Osteoporos Rep.*, 16(1): 58-64, 2018.
- PILO, P.; VILEI, E. M.; PETERHANS, E.; BONVIN-KLOTZ, L.; STOFFEL, M. H.; DOBBELAERE, D. & FREY, J. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol.*, 187(19): 6824-31, 2005.
- PILO, P.; FREY, J. & VILEI, E. M. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J.*, 174(3): 513-21, 2007.
- PINTO, P. M.; CHEMALE, G.; DE CASTRO, L. A.; COSTA, A. P.; KICH, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol.*, 121(1-2): 83-93, 2007.
- PINTO, P. M.; KLEIN, C. S.; ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci.*, 7: 45, 2009.

- PIROFSKI, L. A. & CASADEVALL, A. Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biol.*, 10:6, 2012.
- PITCHER, D. G. & NICHOLAS, R. A. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? *Vet. J.*, 170(3): 300-306, 2005.
- PODOLSKA, A.; ANTHON, C.; BAK, M.; TOMMERUP, N.; SKOVGAARD, K.; HEEGAARD, P. M.; GORODKIN, J.; CICERA, S. & FREDHOLM, M. Profiling microRNAs in lung tissue from pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics*, 13: 459, 2012.
- PURCELL, R. H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; WONG, D. C. & CHANOCK, R. M. A Color Test for the Measurement of Antibody to the non-acid-forming human *Mycoplasma* species. *Am J Epidemiol.*, 84(1): 51-66, 1966.
- RAPOSO, G. & STLOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.*, 200(4): 373-83, 2013.
- RAZIN, S.; YOGEV, D. & NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4): 1094-1156, 1998.
- RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Biosci. Rep.*, 19 (5): 367-372, 1999.
- 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, p. 836-904, 2006.
- RAZIN, S. & HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals.*, 38(2): 183-190, 2010.
- RAYMOND, B. B. A.; MADHKOOR, R.; SCHLEICHER, I.; UPHOFF, C. C.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C. B.; ROHDE, M.; PADULA, M. P. & DJORDJEVIC, S. P. Extracellular Actin Is a Receptor for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.*, 8: 54, 2018.
- REDDY, N. M.; SURYANARAYANA, V.; KALVAKOLANU, D. V.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, M.; HASSOUN, P. M.; KLEEBERGER, S. R. & REDDY, S. P. Innate immunity against bacterial infection following hyperoxia exposure is impaired in Nrf2-deficient mice. *J Immunol.*, 183(7): 4601-8, 2009.
- REHMSMEIER, M., STEFFEN, P., HOCHSMANN, M. & GIEGERICH, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10(10): 1507-17, 2004.
- REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R. & RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901-6, 2000.
- REYNOLDS, T. B. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *Microbiology*, 155(Pt 5): 1386-96, 2009.

- RIFFO-CAMPOS, A. L.; RIQUELME, I. & BREBI-MIEVILLE, P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int J Mol Sci.*, 17(12): e1987, 2016.
- ROBINO, P.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; CHESSA, B.; MICILETTA, M.; NEBBIA, P.; LE GRAND, D. & ROSATI, S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, 109(3-4): 201–209, 2005.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J. & SMYTH, G. K. edgeR a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139-40, 2010.
- ROME, S. Are extracellular microRNAs involved in tipe 2 diabetes and related pathologies? *Clin Biochem.*, 46(10-11): 937-45, 2013.
- ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.; GLEW, M.; LISCHEWSKI, A.; DROESSE, M.; MUCH, P.; WINNER, F.; BRANK, M. & SPERGSER, J. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *Int J Med Microbiol.*, 290(1): 15-25, 2000.
- ROSENGARTEN, R. & WISE, K. S. Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science*, 247(4940): 315-8, 1990.
- ROSS, R. F. & WHITTLESTONE, P. Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. In: J. G. Tully & S. Razin. *Methods in Mycoplasmaology*. Academic Press, Vol 2, p. 115-127, 1983.
- ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B., *et al. Disease of swine*. 8th. Iowa: Iowa State University, p. 495-509, 1999.
- ROSS, D & SIEGEL, D. Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. *Front Physiol.*, 8: 595, 2017.
- ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.*, 83(2): 417-32, 2003.
- RUBY, J. G.; JAN, C. H. & BARTEL, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149): 83-6, 2007.
- RUZICKA, M.; SKOBISOVÁ, E.; DLASKOVÁ, A.; SANTOROVÁ, J.; SPACEK, T.; ZÁCKOVÁ, M.; MODRIANSKÝ, M. & JEZEK, P. Recruitment of mitochondrial uncoupling protein UCP2 after LPS induction. *Int J Biochem Cell Biol.*, 37(4): 809-21, 2005.
- RYDSTRÖM, A. & WICK, M. J. Monocyte and neutrophil recruitment during oral *Salmonella* infection is driven by MyD88-derived chemokines. *Eur J Immunol.*, 39(11): 3019-30, 2009.
- SARAIYA, A. A.; LI, W. & WANG, C. C. Transition of a microRNA from Repressing to Activating Translation Depending on the Extent of Base Pairing with the Target. *PLoS One*, 8(2): e55672, 2013.

SARMA, J. V. & WARD, P. A. The complement system. *Cell Tissue Res.*, 343(1): 227-35, 2011.

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 Res.*, 30(23): 5293-5300, 2002.

SCAPINI, P.; CREPALDI, L.; PINARDI, C.; CALZETTI, F & CASSATELLA, M. A. CCL20 macrophage inflammatory protein-3 α production in LPS-stimulated neutrophils is enhanced by the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and IFN-gamma through independent mechanisms. *Eur J Immunol.*, 32(12): 3515-24, 2002.

SCHAFFER, E. R.; ONEAL, M. J.; MADSEN, M. L. & MINION, F. C. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 153(Pt 11): 3785-3790, 2007.

SCHMIDT, A. & HALL, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.*, 16(13): 1587-609, 2002.

SCHUELER, M.; BRAUN, D. A.; CHANDRASEKAR, G.; GEE, H. Y.; KLASSON, T. D.; HALBRITTER, J.; BIEDER, A.; PORATH, J. D.; AIRIK, R.; ZHOU, W.; LOTURCO, J. J.; CHE, A.; OTTO, E. A.; BÖCKENHAUER, D.; SEBIRE, N. J.; HONZIK, T.; HARRIS, P. C.; KOON, S. J.; GUNAY-AYGUN, M.; SAUNIER, S.; ZERRES, K.; BRUECHLE, N. O.; DRENTH, J. P.; PELLETIER, L.; TAPIA-PÁEZ, I.; LIFTON, R. P.; GILES, R. H.; KERE, J. & HILDEBRANDT, F. DCDC2 Mutations Cause a Renal-Hepatic Ciliopathy by Disrupting Wnt Signaling. *Am J Hum Genet.*, 96(1): 81-92, 2015.

SCHULTZ, S. J.; FRY, A. M.; SÜTTERLIN, C.; RIED, T. & NIGG, E. A. Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ.*, 5(6): 625-35, 1994.

SEYMOUR, L. M.; DEUTSCHER, A. T.; JENKINS, C.; KUIT, T. A.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; CROSSET, B.; PADULA, M.; DIXON, N. E.; DJORDJEVIC, S. P. & WALKER, M. J. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J Biol Chem.*, 285(44): 33971-8, 2010.

SEYMOUR, L. M.; FALCONER, L.; DEUTSCHER, A. T.; MINION, F. C.; PADULA, M. P.; DIXON, N. E.; DJORDJEVIC, S. P. & WALKER, M. J. Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biol Chem.*, 286(12): 10097-104, 2011.

SEYMOUR, L. M.; JENKINS, C.; DEUTSCHER, A. T.; RAYMOND, B. B.; PADULA, M. P.; TACCHI, J. L.; BOGEMA, D. R.; EAMENS, G. J.; WOOLLEY, L. K.; DIXON, N. E.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol.*, 14(1): 81-94, 2012.

SHARBATI, J.; LEWIN, A.; KUTZ-LOHROFF, B.; KAMAL, E.; EINSPANIER, R. & SHARBATI, S. Integrated MicroRNA-mRNA-Analysis of Human Monocyte Derived

Macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection. PLoS One, 6(5): e20258, 2011.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M. & DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J., 360(Pt 1): 1-16, 2001.

SHEN, X.; GUMULAK, J.; YU, H.; FRENCH, C. T.; ZOU, N. & DYBVIG, K. Gene rearrangements in the *vsa* locus of *Mycoplasma pulmonis*. J Bacteriol., 182(10): 2900-8; 2000.

SHI, L.; CHEN, Z. G.; WU, L. L.; ZHENG, J. J.; YANG, J. R.; CHEN, X. F.; CHEN, Z. Q., LIU, C. L.; CHI, S. Y.; ZHENG, J. Y.; HUANG, H. X.; LIN, X. Y. & ZHENG, F. miR-340 reverses cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting Nrf2-dependent antioxidant pathway. Asian Pac J Cancer Prev., 15(23): 10439-44, 2014.

SHI, L.; KOLL, F.; ARNAIZ, O. & COHEN, J. The Ciliary Protein IFT57 in the Macronucleus of *Paramecium*. J Eukaryot Microbiol., 65(1): 12-27, 2018.

SHIRIN, H.; SORDILLO, E. M.; YAMAMOTO, H.; DELOHERY, T.; WEINSTEIN, I. B. & MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* Inhibits the G1 to S Transition in AGS Gastric Epithelial Cells. Cancer Res., 59(10): 2277-81, 1999.

SILVERMAN, J. M. & REINER, N. E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. Cell Microbiol., 13(1): 1-9, 2011.

SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; MAES, D. & DELLAGOSTIN, O. A. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. Vet Microbiol. 165(3-4): 234-42, 2013.

SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, A. & SCHRANK, I. S. *Mycoplasma hyopneumoniae* transcription unit organization: genome survey and prediction. DNA Res., 18(6): 413-422, 2011.

SIQUEIRA, F. M.; THOMPSON C. E.; VIRGINIO, V. G.; GONCHOROSKI, T.; REOLON, L.; ALMEIDA, L. G.; DA FONSECA, M. M.; DE, S. R.; PROSDOCIMI, F.; SCHRANK, I. S.; FERREIRA, H. B.; DE VASCONCELOS, A. T. & ZAHA, A. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. BMC Genomics, 14: 175, 2013.

SIQUEIRA, F. M.; DE SOUTO, W. S.; CATTANI, A. M. & SCHRANK, I. S. Genome organization in *Mycoplasma hyopneumoniae*: identification of promoter-like sequences. Mol. Biol. Rep., 41(8); 5395-5402, 2014.

SIQUEIRA, F. M.; MORAIS, G. L.; HIGASHI, S.; BEIER, L. S.; BREYER, G. M.; GODINHO, C. P. S.; SAGOT, M.-F.; SCHRANK, I. S.; ZAHA, A. & VASCONCELOS, A. T. R. Mycoplasma non-coding RNA: identification of small RNAs and targets. BMC Genomics, 17(Suppl 8): 743, 2016.

SIQUEIRA, F. M.; PÉREZ-WOHLFEIL, E.; CARVALHO, F. M.; TRELLES, O.; SCHRANK, I. S.; VASCONCELOS, A. T. R. & ZAHA, A. Microbiome overview in swine lungs. PLoS One, 12(7): e0181503, 2017.

- SOLER, L.; LUYTEN, T.; STINCKENS, A.; BUYS, N.; CÉRON, J. J. & NIEWOLD, T. A. *Vet Immunol Immunopathol.*, 141(1-2): 109-15, 2011.
- STAEDEL, C. & DARFEUILLE, F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol.*, 15(9): 1496-507, 2013.
- STARNER, T. D.; BARKER, C. K.; JIA, H. P.; KANG, Y. & MCCRAY, P. B. JR. CCL20 Is an Inducible Product of Human Airway Epithelia with Innate Immune Properties. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 29(5): 627-33, 2003.
- STEMKE, G. W.; LAIGRET, F.; GRAU, O. & BOVÉ, J. M. Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. *Int J Syst Bacteriol.*, 42(2): 220-5, 1992.
- STEMKE, G. W. & ROBERTSON, J. A. The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* based upon ATP-dependent luminometry. *Vet Microbiol.*, 24(2): 135-42, 1990.
- STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S. L.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R., KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.-S.; WU, Z.; PAULSENK, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S. & OSLON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799): 959-964, 2000.
- STURM, A.; LENSCH, M.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; WIEDENMANN, B.; ROSEWICZ, S.; DIGNASS, A. U. & GABIUS, H. J. Human galectin-2 novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol.*, 173(6): 3825-37, 2004.
- SUN, C. G.; ZHANG, J. & HU, W. N. CCNG2 expression is downregulated in colorectal carcinoma and its clinical significance. *Tumor Biol.*, 35(4): 3339-46, 2014.
- SWEENEY, C.; MURPHY, M.; KUBELKA, M.; RAVNIK, S. E.; HAWKINS, C. F.; WOLGEMUTH, D. J. & CARRINGTON, M. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development*, 122(1): 53-64, 1996.
- SZCZEPANEK, S. M.; BOCCACCIO, M.; PFLAUM, K.; LIAO, X. & GEARY, S. J. Hydrogen peroxide production from glycerol metabolism is dispensable for virulence of *Mycoplasma gallisepticum* in the tracheas of chickens. *Infect Immun.*, 82(12): 4915-20, 2014.
- TACCHI, J. L.; RAYMOND, B. B.; HAYNES, P. A.; BERRY, I. J.; WIDJAJA, M.; BOGEMA, D. R.; WOLLEY, L. K.; JENKINS, C.; MINION, F. C.; PADULA, M. P. & DJORDJEVIC, S. P. Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol.*, 6(2): 150210, 2016.

TAGANOV, K. D.; BOLDIN, M. P.; CHANG, K. J. & BALTIMORE, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(33): 12481-6, 2006.

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

TARKAR, A.; LOGES, N. T.; SLAGLE, C. E.; FRANCIS, R.; DOUGHERTY, G. W.; TAMAYO, J. V.; SHOOK, B.; CANTINO, M.; SCHWARTZ, D.; JAHNKE, C.; OLBRICH, H.; WERNER, C.; RAIDT, J.; PENNEKAMP, P.; ABOUHAMED, M.; HJEIJ, R.; KOHLER, G.; GRIESE, M.; LI, Y.; LEMKE, K.; KLENA, N.; LIU, X.; GABRIEL, G.; TOBITA, K.; JASPERS, M.; MORGAN, L. C.; SHAPIRO, A. J.; LETTEBOER, S. J.; MANS, D. A.; CARSON, J. L.; LEIGH, M. W.; WOLF, W. E.; CHEN, S.; LUCAS, J. S.; ONOUFRIADIS, A.; PLAGNOL, V.; SCHMIDTS, M.; BOLDT, K.; UK10K; ROEPMAN, R.; ZARIWALA, M. A.; LO, C. W.; MITCHISON, H. M.; KNOWLES, M. R.; BURDINE, R. D.; LOTURCO, J. J. & OMRAN, H. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat Genet.*, 45(9): 995-1003, 2013.

TASSEW, D. D.; MECHESSO, A. F.; PARK, N. H.; SONG, J. B.; SHUR, J. W. & PARK, S. C. Biofilm formation and determination of minimum biofilm eradication concentration of antibiotics in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Vet Med Sci.*, 79(10): 1716-1720, 2017.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim. Health Res. Rev.*, 5(2): 317-320, 2004. THACKER, E. L.; HALBUR, P. G.; ROSS, R. F.; THANAWONGNUWECH, R. & THACKER, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. *J. Clin Microbiol.*, 37(3): 620-7, 1999.

THACKER, E. L. & MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J. J.; Karriker, L. A.; Ramirez, A.; Schwartz, K. J. & Stevenson, G. W. *Diseases of Swine*. John Wiley and Sons, Inc, p. 779-797, 2012.

THIMMULAPPA, R. K.; LEE, H.; RANGASAMY, T.; REDDY, S. P.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, M. & BISWAL, S. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest.*, 116(4): 984-95, 2006.

THURSTON, T. L.; WANDEL, M. P.; VON MUHLINEN, N.; FOEGLEIN, A. & RANDOW, F. Galectin-8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*, 482(7385): 414-8, 2012.

TIAN, T.; WANG, Y.; WANG, H.; ZHU, Z. & XIAO, Z. Visualizing of the Cellular Uptake and Intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem.*, 111(2): 488-96, 2010.

TIAN, T.; ZHU, Y. L.; HU, F. H.; WANG, Y. Y.; HUANG, N. P. & XIAO, Z. D. Dynamics of Exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol.*, 228(7): 1487-95, 2013.

TRUESDELL, S. S.; MORTENSEN, R. D.; SEO, M.; SCHROEDER, J. C.; LEE, J. H.; LETONQUENZE, O. & VASUDEVAN, S. MicroRNA-mediated mRNA Translation

Activation in Quiescent Cells and Oocytes Involves Recruitment of a Nuclear microRNP. *Sci Rep.*, 2: 842, 2012.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M.; LEE, J. J. & LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.*, 9(6): 654-9, 2007.

VANLAERE, I. & LIBERT, C. Matrix Metalloproteinases as Drug Targets in Infections Caused by Gram-Negative Bacteria and in Septic Shock. *Clin Microbiol Rev.*, 22(2): 224-39, 2009.

VASCONCELOS, A. T.; FERREIRA, H. B.; BIZARRO, C. V.; BONATTO, S. L.; CARVALHO, M. O.; PINTO, P. M.; ALMEIDA, D. F.; ALMEIDA, L. G.; ALMEIDA, R.; VES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E. N.; AZEVEDO, V. A.; BOGO, M. R.; BRIGIDO, M. M.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, S. S.; CAREPO, M. S.; CARRARO, D. M.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R. G.; CUNHA, C. W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M. S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T. B.; GRISARD, E. C.; GUIMARAES, C. T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S. N.; KRIEGER, M. A.; LAURINO, J. P.; LIMA, L. F.; LOPES, M. I.; LORETO, E. L.; MADEIRA, H. M.; MANFIO, G. P.; MARANHAO, A. Q.; MARTINKOVICS, C. T.; MEDEIROS, S. R.; MOREIRA, M. A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C. E.; NICOLAS, M. F.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXAO, R. F.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L. S.; POTRICH, D. P.; SALIM, A. C.; SANTOS, F. R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M. P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S.; SCHUCK, A. F.; 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*. *J. Bacteriol.*, 187(16):5568-5577, 2005.

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. *NatRev Microbiol.*, 7(6): 424-38, 2009.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y. & STEITZ, J. A. Switching from repression to activation miRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858): 1931-4, 2007.

VASUDEVAN, S. Posttranscriptional Upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 3(3): 311-30, 2011.

VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A. & HAESENBROUCK, F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol.*, 97(3-4): 177-90, 2003.

VILEI, E. M. & FREY, J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 8(1): 85-92, 2001.

- VILLARREAL, I.; MAES, D.; MEYNS, T.; GEBRUERS, F.; CALUS, D.; PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine*, 27: 1875-9, 2009.
- VOORDE, V. J.; BALZARINI, J & LIEKENS, S. Mycoplasmas and cancer: focus on nucleoside metabolism. *EXCLI J.*, 13: 300-22, 2014.
- WADSWORTH, P. TPX2. *Curr Biol.*, 25(24): R1156-8, 2015.
- WAGHRAY, M.; CUI, Z.; HOROWITZ, J. C.; SUBRAMANIAN, I. M.; MARTINEZ, F. J.; TOEWS, G. B. & THANNICKAL, V. J. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J.*, 19(7): 854-6, 2005.
- WANG, W. J. TAY, H. G.; SONI, R.; PERUMAL, G. S.; GOLL, M. G.; MACALUSO, F. P.; ASARA, J. M.; AMACK, J. D. & TSOU, M. F. CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. *Nat Cell Biol.*, 15(6): 591-601, 2013.
- WANG, Z.; FAN, M.; CANDAS, D.; ZHANG, T. Q.; QIN, L.; ELDRIDGE, A.; WACHSMANN-HOGIU, S.; AHMED, K. M.; CHROMY, B. A.; NATAJIT, D.; DURU, N.; HE, F.; CHEN, M. FINKEL, T.; WEINSTEIN, L. S. & LI, J. J. CyclinB1/Cdk1 Coordinates Mitochondrial Respiration for Cell Cycle G2/M Progression. *Dev Cell.*, 29(2): 217-32, 2014.
- WEBER, S. S.; SANT'ANNA, F. H. & SCHRANK, I. S. Unveiling *Mycoplasma hyopneumoniae* promoters: sequence definition and genomic distribution. *DNA Res.*, 19(2): 103-115, 2012.
- WEINER III, J.; ZIMMERMAN, C.-U.; GOHLMANN, H. W. H. & HERRMANN, R. Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. *Nucleic Acids Res.*, 31(21): 6306-6320, 2003.
- WEITZEL, R. P.; LESNIEWSKI, M. L.; HAVIERNIK, P.; KADEREIT, S.; LEAHY, P.; GRECCO, N. J. & LAUGHLIN, M. J. microRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4+ T cells. *Blood*, 113(26): 6648-57, 2009.
- WHITTLESTONE, P. Porcine Mycoplasmas. In: J. G. Tully & R. F. Whitcomb. *The Mycoplasmas*. Academic Press, Vol II, p. 133-176, 1979.
- WILCZYNSKA, A. & BUSHELL, M. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ.*, 22(1): 22-33, 2015.
- WILTON, J.; JENKINS, C.; CORDWELL, S. J.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; ONEAL, D. C.; DJORDJEVIC, M. A.; CONNOLLY, A.; BARCHIA, I.; WALKER, M. J. & DJORDJEVIC, S. P. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol.*, 71(3): 566-62, 2009.
- WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.*, 11(3): 228-34, 2009.

- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*, 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54(Pt 3): 871-875, 2004.
- WOLTER, P.; SCHMITT, K.; FACKLER, M.; KREMLING, H.; PROBST, L.; HAUSER, S.; GRUSS, O. J. & GAUBATZ, S. GAS2L3, a target gene of the DREAM complex, is required for proper cytokinesis and genomic stability. *J Cell Sci.*, 125(Pt 10): 2393-406, 2012.
- WOOLNER, S.; O'BRIEN, L. L.; WIESE, C. & BEMENT, W. M. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J Cell Biol.*, 182(1): 77-88, 2008.
- WOUDE, M. W. & BÄUMLER, A. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev.*, 17(3): 581-611, 2004.
- WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R. & TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.*, 134(3): 489-92, 2004.
- XU, J.; TANG, Y.; BEI, Y.; DING, S.; CHE, L.; YAO, J.; WANG, H.; LV, D. & XIAO, J. miR-19b attenuates H₂O₂-induced apoptosis in rat H9C2 cardiomyocytes via targeting PTEN. *Oncotarget*, 7(10): 10870-8, 2016.
- XU, X. L.; MA, W.; ZHU, Y. B.; WANG, C.; WANG, B. Y.; AN, N.; AN, L.; LIU, Y.; WU, Z. H.; TIAN, J. H. The Microtubule-Associated Protein ASPM Regulates Spindle Assembly and Meiotic Progression in Mouse Oocytes. *PLoS One*, 7(11): e49303, 2012.
- YAMAMOTO, R.; OBBINENI, J. M.; ALFORD, L. M.; IDE, T.; OWA, M.; HWANG, J.; KON, T.; INABA, K.; JAMES, N.; KING, S. M.; ISHIKAWA, T.; SALE, W. S. & DUTCHER, S. K. *Chlamydomonas* DYX1C1/PF23 is essential for axonemal assembly and proper morphology of inner dynein arms. *PLoS One*, 13(9): e1006996, 2017.
- YAMAO, F.; MUTO, A.; KAWAUCHI, Y.; IWAMI, M.; IWAGAMI, S.; AZUMI, Y. & OSAWA, S. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82(8): 2306-2309, 1985.
- YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R.; ANDREU, Z.; ZAVEC, A. B.; BORRÀS, F. E.; BUZAS, E. I.; BUZAS, K.; CASAL, E.; CAPPELLO, F.; CARVALHO, J.; COLÁS, E.; CORDEIRO-DA SILVA, A.; FAIS, S.; FALCON-PEREZ, J. M.; GHOBRIAL, I. M.; GIEBEL, B.; GIMONA, M.; GRANER, M.; GURSEL, I.; GURSEL, M.; HEEGAARD, N. H.; HENDRIX, A.; KIERULF, P.; KOKUBUN, K.; KOSANOVIC, M.; KRALJ-IGLIC, V.; KRÄMER-ALBERS, E. M.; LAITINEN, S.; LÄSSER, C.; LENER, T.; LIGETI, E.; LINĚ, A.; LIPPS, G.; LLORENTE, A.; LÖTVALL, J.; MANČEK-KEBER, M.; MARCILLA, A.; MITTELBRUNN, M.; NAZARENKO, I.; NOLTE-THOEN, E. N.; NYMAN, T. A.; O'DRISCOLL, L.; OLIVAN, M.; OLIVEIRA, C.; PÁLLINGER, É.; DEL PORTILLO, H. A.; REVENTÓS, J.; RIGAU, M.; ROHDE, E.; SAMMAR, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; SANTARÉM, N.; SCHALLMOSER, K.; OSTENFELD, M. S.; STOORVOGEL, W.; STUKELJ, R.; VAN DER GREIN, S. G.; VASCONCELOS, M. H.; WAUBEN, M. H. & DE WEVER, O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4: 27066, 2015.

- YANG, H.; QU, L.; CHEN, L.; LIU, W.; LIU, C.; MENG, L.; WU, J. & SHOU, C. *Mycoplasma hyorhinis* infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. *BMC Gastroenterol.*, 10: 132, 2010.
- YANG, H.; LI, T. W.; ZHOU, Y.; PENG, H.; LIU, T.; ZANDI, E.; MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; MATO, J. M. & LU, S. C. Activation of a Novel c-Myc-miR27-Prohibitin 1 Circuitry in Cholestatic Liver Injury Inhibits Glutathione Synthesis in Mice. *Antioxid Redox Signal.*, 22(3): 259-74, 2015.
- YANG, M.; YAO, Y.; EADES, G.; ZHANG, Y. & ZHOU, Q. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res Treat.*, 129(3): 983-91, 2011.
- YASUNAGA, T.; HOFF, S.; SCHELL, C.; HELMSTÄDTER, M.; KRETZ, O.; KUECHLIN, S.; YAKULOV, T. A.; ENGEL, C.; MÜLLER, B.; BENSCH, R.; RONNENBERGER, O.; HUBER, T. B.; LIENKAMP, S. S. & WALZ, G. The polarity protein Inturned links NPHP4 to Daam1 to control the subapical actin network in multiciliated cells. *J Cell Biol.*, 211(5): 963-73, 2015.
- YEBRA, M. J.; ZÚÑIGA, M.; BEAUFILS, S.; PÉREZ-MARNTÍNEZ, G.; DEUTSCHER, J. & MONEDERO, V. Identification of a gene cluster enabling *Lactobacillus casei* BL23 to utilize myo-inositol. *Appl Environ Microbiol.*, 73(12): 3850-8, 2007.
- YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R.; WATSON-MCKOWN, R. & WISE, K. S. Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. *EMBO J.*, 10(13): 4069-79, 1991.
- YOSHIDA, K.; YAMAGUCHI, M.; MORINAGA, T.; KINEHARA, M.; IKEUCHI, M.; ASHIDA, H. & FUJITA, Y. myo-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.*, 283(16): 10415-24, 2008.
- YOUNG, T. F.; THACKER, E. L.; ERICKSON, B. Z. & ROSS, R. F. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol.*, 71(3-4): 269-79, 2000.
- YUS, E.; MAIER, T.; MICHALODIMITRAKIS, K.; NOORT, V.; YAMADA, T.; CHEN, W.-H.; WODKE, J. A. H.; GÜELL, M.; MARTÍNEZ, S.; BOURGEOIS, R.; KÜHNER, S.; RAINERI, E.; LETUNIC, I.; KALININA, O. V.; RODE, M.; HERRMANN, R.; GUTIÉRREZ-GALLEGO, R.; RUSSEL, R. B.; GAVIN, A.-C.; BORK, P. & SERRANO, L. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science*, 326(5957): 1263-1268, 2009.
- ZENG, F. R.; TANG, L. J.; HE, Y. & GARCIA, R. C. An update on the role of miRNA-155 in pathogenic microbial infections. *Microbes Infect.*, 17(9): 613-21, 2015.
- ZHANG, M.; AN, C.; GAO, Y.; LEAK, R. K.; CHEN, J. & ZHANG, F. Emerging Roles of Nrf2 and Phase II Antioxidant Enzymes in Neuroprotection. *Prog Neurobiol.*, 100: 30-47, 2013.

ZHANG, Q.; YOUNG, T. F. & ROSS, R. F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun.*, 63(3): 1013-9, 1995.

ZHANG, W. & BASEMAN, J. B. Transcriptional response of *Mycoplasma genitalium* to osmotic stress. *Microbiology*, 157(Pt 2): 548-556, 2011.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; CAO, R.; LIU, H. L.; CUI, X. S.; KIM, N. H.; RUI, R. & SUN, S. C. Small GTPase RhoA regulates cytoskeleton dynamics during porcine oocyte maturation and early embryo development. *Cell Cycle*, 13(21): 3390-403, 2014.

ZHAO, Y.; COLOFF, J. L.; FERGUSON, E. C.; JACOBS, S. R.; CUI, K. & RATHMELL, J. C. Glucose Metabolism Attenuates p53 and Puma-dependent Cell Death upon Growth Factor Deprivation. *J Biol Chem.*, 283(52): 36344-53, 2008.

ZHOU, J.; YANG, F.; LEU, N. A. & WANG, P. J. MNS1 Is Essential for Spermiogenesis and Motile Ciliary Functions in Mice. *PLoS Genet.*, 8(3): e1002516, 2012.

ZIELINSKI, G. C. & ROSS, R. F. Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. *Am J Vet Res.*, 51(3): 344-348, 1990.

9. ANEXOS

9.1 Material Suplementar referente ao artigo: *Mycoplasma hyopneumoniae* elicits an antioxidant response and decreases the expression of ciliary genes in infected swine epithelial cells.

Figure S1. Distribution of intracellular sRNAs sizes and types.

Figure S2. RT-qPCR of selected DE genes.

Figure S3. Production of hydrogen peroxide by different *M. hyopneumoniae* strains.

Table S1. Trimming and mapping information of mRNA reads.

Table S2. Trimming and mapping information of miRNA reads.

Table S3. mRNA Read Counts Information

Table S4. Complete DE Gene List (p-value > 0.05).

Table S5. ARE motifs in NRF2 putative regulated genes.

Table S6. mRNA Complete GO Enrichment Analysis.

Table S7. Novel Putative miRNAs of *Sus scrofa*.

Table S8. miRNA Read Counts Information

Table S9. Complete DE miRNA List (p > 0.05).

Table S10. sRNAs from *M. hyopneumoniae* detected in extracellular samples S7 and S8.

Table S11. Permissive and repressive target pairs between miRNAs and mRNAs.

Table S12. Complete GO Enrichment Analysis of DE miRNA targets.

Table S13. Primers for RT-qPCR of selected DE genes.

As tabelas suplementares podem ser visualizadas através do link:

<https://tinyurl.com/supptablmucha2018>

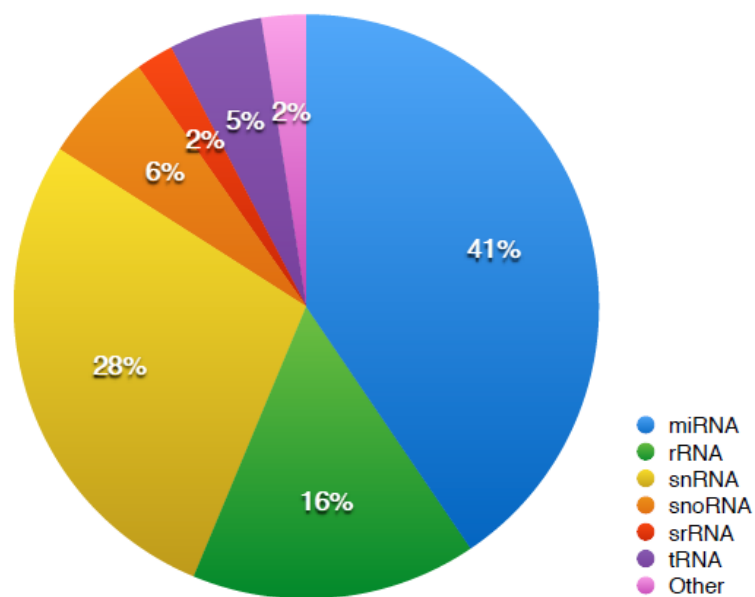
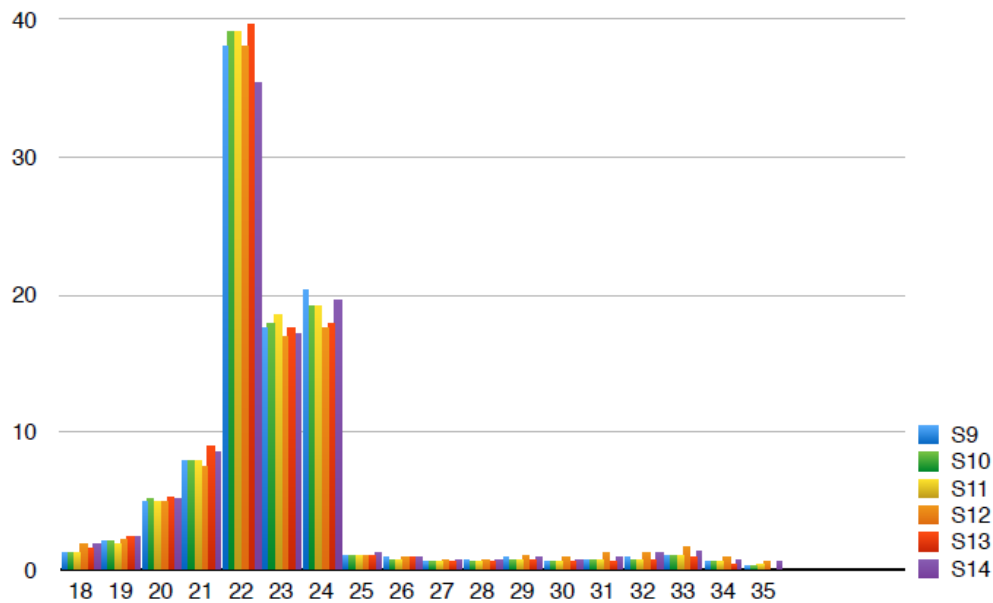


Figure S1. Distribution of intracellular sRNAs sizes and types. **A.** Intracellular sRNAs showed a pronounced peak at 22nt, in accordance with a typical miRNA-type size distribution curve. **B.** The distribution of reads based on homology also showed that the most predominant portion of intracellular sRNAs clean reads (41%) were similar to previously described miRNAs in the literature.

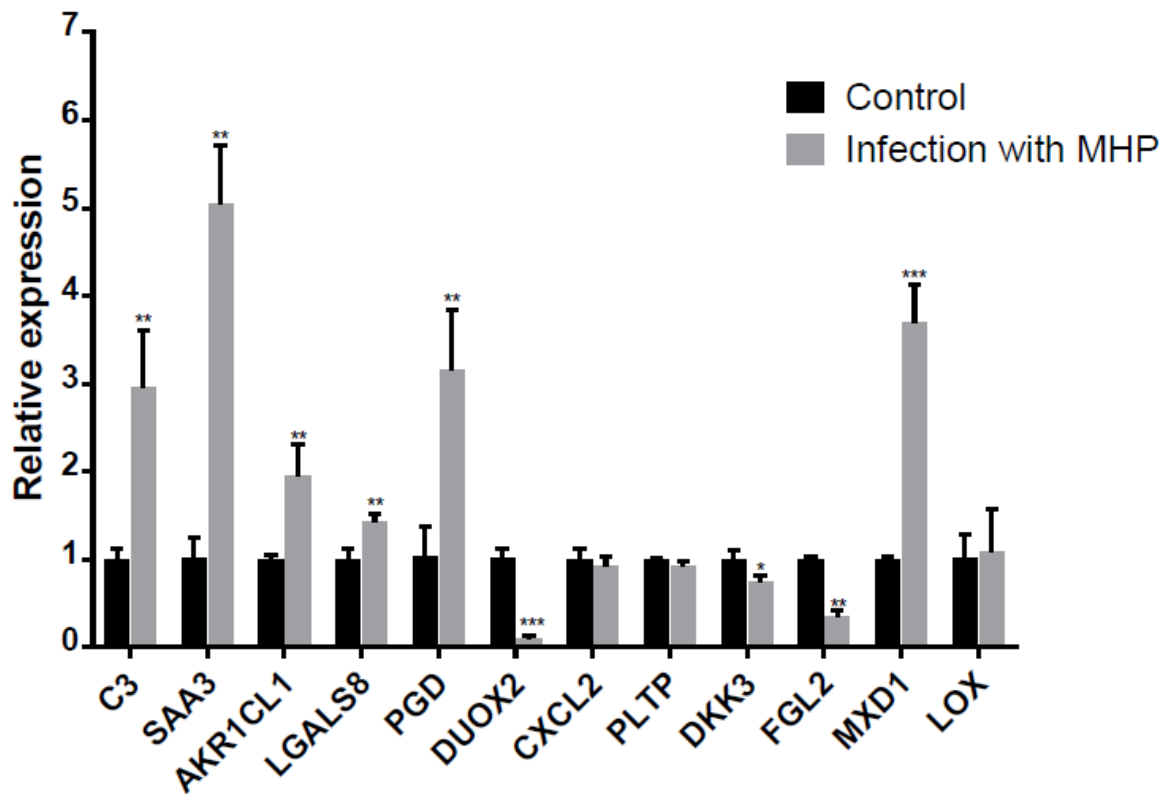


Figure S2. RT-qPCR of selected DE genes. Eight up-regulated and four down-regulated genes were selected for experimental validation by RT-qPCR. Of these, five up-regulated (C3, SAA3, AKR1CL1, LGALS8 and PGD) and two down-regulated (DKK3 and FGL2) were in accordance with the expression of sequencing data. CXCL2, PLTP and LOX showed no different expression in RT-qPCR, and DUOX2 and MXD1 showed inversed expression in RT-qPCR in relation to the sequencing data ($P < 0.05$).

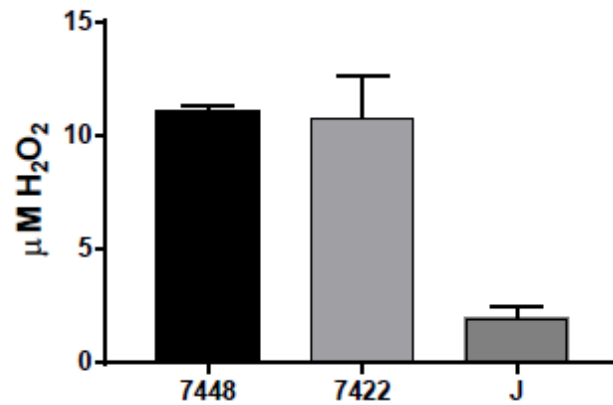
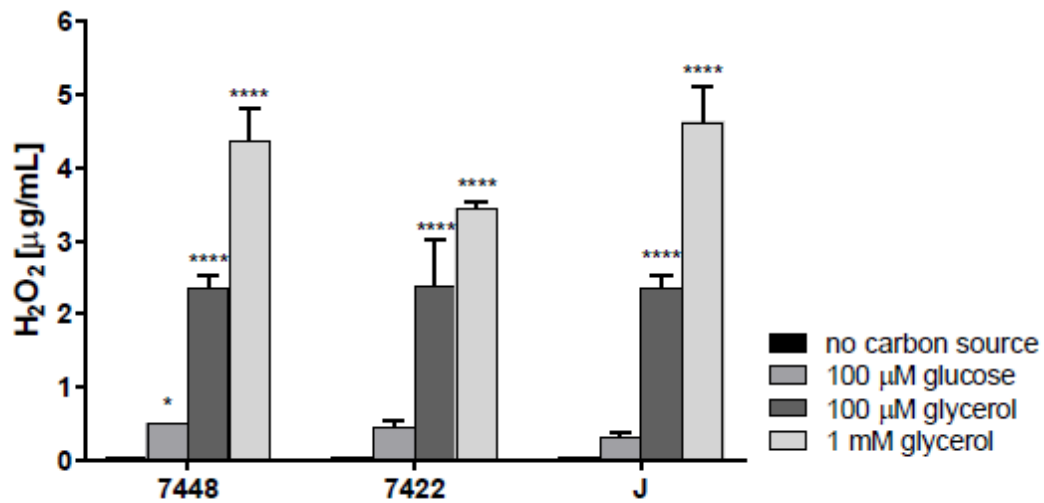
A**B**

Figure S3. Production of hydrogen peroxide by different *M. hyopneumoniae* strains. **A.** In minimum defined medium. **B.** In the presence of different carbon sources. In stress conditions, the attenuated strain *M. hyopneumoniae* J is able to produce hydrogen peroxide. When cultured in minimum defined medium, hydrogen peroxide production was small; however, when glycerol was the only carbon source available, the attenuated strain produced the metabolic product in similar concentrations to the pathogenic strains of this species.

9.2 Identificação de seqüências referentes ao elemento de resposta antioxidante (ARE) na região promotora de genes putativos regulados por NRF2.

GeneID	Start (Up-stream from ATG)	Stop (Up-stream from ATG)	Strand	Sequence (19nt)	Sequence (11nt)	Consensus
ENSSSCG00000017092 (GPX3)	495	514	-	GATTCCTTAGTTG GCTTGGG	CTTAGTTG GCT	C T T A G T T G G C T
ENSSSCG00000029876 (SOD2)	657	638	+	AATTGTTGACAAA GCACTTA	TTGACAAA GCA	T T G A C A A A G C A
	341	322	+	ATACTATTATCAG GCCTGGC	ATTATCAG GCC	A T T A T C A G G C C
	858	839	-	CAAGGATGACTAG GCTTTGG	ATGACTAG GCT	A T G A C T A G G C T
	545	526	-	TCTTGATTATTAAG CCTTAG	ATTATTAA GCC	A T T A T T A A G C C
	354	335	-	ATAGTATTACTGA GCACCCA	ATTACTGA GCA	A T T A C T G A G C A
	297	278	-	CCAGAGTGACCTT GCTTTCC	GTGACCTT GCT	G T G A C C T T G C T
ENSSSCG00000010853 (EPHX1)	371	352	-	TCTTAATTAGGAT GCAAGAG	ATTAGGAT GCA	A T T A G G A T G C A
	86	67	-	TGATTTTTACCTTG CATAAG	TTTACCTTG CA	T T T A C C T T G C A
ENSSSCG00000028982 (AKR1C4)	657	638	+	ACCTGGTGAGGCC GCTGAAG	GTGAGGCC GCT	G T G A G G C C G C T
	377	358	+	ATATGTTTAGAAG GCTGACA	TTTAGAAG GCT	T T T A G A A G G C T
ENSSSCG00000011147 (AKR1C1)	927	908	+	TAATATTGATCAA GCTGATA	TTGATCAA GCT	T T G A T C A A G C T
	655	636	+	CTGTTGTGACTCA GCAGTTT	GTGACTCA GCA	G T G A C T C A G C A
	149	130	+	GACAAGTTAATTG GCTTCGA	GTTAATTG GCT	G T T A A T T G G C T
	107	88	+	CTGCTTTGACCTTG CTCCTC	TTGACCTT GCT	T T G A C C T T G C T
	647	628	-	AGGTTCTTAAACT GCTGAGT	CTTAAACT GCT	C T T A A A C T G C T
	362	343	-	AGTCATTTAATAA GCATTTT	TTTAATAA GCA	T T T A A T A A G C A
ENSSSCG00000025277 (ARR1CL1)	657	638	+	ACCTGGTGAGGCC GCTGAAG	GTGAGGCC GCT	G T G A G G C C G C T
	377	358	+	ATATGTTTAGAAG GCTGACA	TTTAGAAG GCT	T T T A G A A G G C T
ENSSSCG00000010682 (PRDX3)	561	542	+	AACCTATGATGCA GCTTGCA	ATGATGCA GCT	A T G A T G C A G C T
	473	454	+	CACGTCTTAACCTG	CTTAACCT	C T T A A C C T G C T

				CTGAGC	GCT															
	82	63	+	GAACCATGAGGTT GCAGGTT	ATGAGGTT GCA	A	T	G	A	G	G	T	T	G	C	A				
	755	736	-	CCTTCTTGAATATG CATGTT	TTGAATAT GCA	T	T	G	A	A	T	A	T	G	C	A				
	485	466	-	AAGACGTGACATA GCGTCCA	GTGACATA GCG	G	T	G	A	C	A	T	A	G	C	G				
	74	55	-	AGGGATTGAACCT GCAACCT	TTGAACCT GCA	T	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A				
ENSSSCG00000 015844 (GSR)	900	881	+	GGTGACTTACGCT GCAGGGA	CTTACGCT GCA	C	T	T	A	C	G	C	T	G	C	A				
	176	157	+	TCACCGTGAGGCT GCGCCGG	GTGAGGCT GCG	G	T	G	A	G	G	C	T	G	C	G				
	562	543	-	CGTTTTTGAGGGC GCTGTTT	TTGAGGGC GCT	T	T	G	A	G	G	G	C	G	C	T				
	491	472	-	CTTTTCTGAGCGG GCCCTT	CTGAGCGG GCC	C	T	G	A	G	C	G	G	G	C	C				
	187	168	-	TCACGGTGACTAA GCACCCG	GTGACTAA GCA	G	T	G	A	C	T	A	A	G	C	A				
ENSSSCG00000 025762 (GSR)	141	122	-	GCGGCCTTAAAAA GCAAAAA	CTTAAAAA GCA	C	T	T	A	A	A	A	A	G	C	A				
	52	33	-	CGGATCTGACATT GCTGTGG	CTGACATT GCT	C	T	G	A	C	A	T	T	G	C	T				
ENSSSCG00000 013030 (PRDX5)	667	648	+	ACATTTTTATTTTG CATTCA	TTTATTTTG CA	T	T	T	A	T	T	T	T	G	C	A				
	348	329	+	GCGACATGAAGCT GCTCACC	ATGAAGCT GCT	A	T	G	A	A	G	C	T	G	C	T				
	324	305	+	ACTTGCTGAGCTC GCATGTG	CTGAGCTC GCA	C	T	G	A	G	C	T	C	G	C	A				
	254	235	-	GGGGCCTGAGGTC GCCCCCG	CTGAGGTC GCC	C	T	G	A	G	G	T	C	G	C	C				
ENSSSCG00000 014540 (FTH1)	480	461	+	TTTGCATTACCAG GCACCTC	ATTACCAG GCA	A	T	T	A	C	C	A	G	G	C	A				
	932	913	-	AGAAGCTGAAGGC GCGGAAC	CTGAAGGC GCG	C	T	G	A	A	G	G	C	G	C	G				
	848	829	-	CCATTTTGAATG GCCGATC	TTGAAATG GCC	T	T	G	A	A	A	T	G	G	C	C				
ENSSSCG00000 013736 (PRDX2)	603	584	+	CGGATGTGACAGT GCGGAAA	GTGACAGT GCG	G	T	G	A	C	A	G	T	G	C	G				
	430	411	+	CTGTCTTTAAGCA GCTTAAC	TTTAAGCA GCT	T	T	T	A	A	G	C	A	G	C	T				
	34	15	+	GATAAATGACGTG GCTGCTT	ATGACGTG GCT	A	T	G	A	C	G	T	G	G	C	T				
	639	620	-	TTCTCCTGATGCTG CAGCTG	CTGATGCT GCA	C	T	G	A	T	G	C	T	G	C	A				
	425	406	-	CCCATGTTAAGCT GCTTAAA	GTTAAGCT GCT	G	T	T	A	A	G	C	T	G	C	T				
	283	264	-	TTATCTTTATTCA CCGGGC	TTTATTCA GCC	T	T	T	A	T	T	C	A	G	C	C				

ENSSSCG00000 000843 (TXNRD1)	697	678	+	ACTTACTTATTTAG CCTTTT	CTTATTTA GCC	C	T	T	A	T	T	T	A	G	C	C
	531	512	+	TGTTGTTTACCAAG CCCCTG	TTTACCAA GCC	T	T	T	A	C	C	A	A	G	C	C
	971	952	-	AAATCTTTAATAA GCACACA	TTTAATAA GCA	T	T	T	A	A	T	A	A	G	C	A
	498	479	-	GAATAATGAACAG GCTTTGG	ATGAACAG GCT	A	T	G	A	A	C	A	G	G	C	T
	117	98	-	GTTTTGTGAAAGA GCCCTTC	GTGAAAGA GCC	G	T	G	A	A	A	G	A	G	C	C
ENSSSCG00000 002754 (NQO1)	822	803	+	AGTGTTTTAATCTG CCATGA	TTTAATCT GCC	T	T	T	A	A	T	C	T	G	C	C
	216	197	+	TCACAGTGACTCA GCGAGAT	GTGACTCA GCG	G	T	G	A	C	T	C	A	G	C	G
	889	870	-	GAACCATGAGGTT GCAGGTT	ATGAGGTT GCA	A	T	G	A	G	G	T	T	G	C	A
ENSSSCG00000 003153 (FTL)	499	480	+	AGATACTTAGGGT GCTCTCT	CTTAGGGT GCT	C	T	T	A	G	G	G	T	G	C	T
	122	103	+	TTTCTCTGAGGTTG CATATC	CTGAGGTT GCA	C	T	G	A	G	G	T	T	G	C	A
	87	68	+	TCTCTCTGAAGCTG CCTCTG	CTGAAGCT GCC	C	T	G	A	A	G	C	T	G	C	C
	57	38	-	TGATCTTGAAGGA GCATGTG	TTGAAGGA GCA	T	T	G	A	A	G	G	A	G	C	A
ENSSSCG00000 003402 (PGD)	857	838	+	CTCTCCTGAGCCA GCCCTAG	CTGAGCCA GCC	C	T	G	A	G	C	C	A	G	C	C
	198	179	+	AATCCGTGAAGTA GCAGAGT	GTGAAGTA GCA	G	T	G	A	A	G	T	A	G	C	A
	886	867	-	CATCGATGACATC GCTCCGG	ATGACATC GCT	A	T	G	A	C	A	T	C	G	C	T
ENSSSCG00000 003914 (PRXD1)	898	879	+	AAGGCGTGAAACA GCTACAC	GTGAAACA GCT	G	T	G	A	A	A	C	A	G	C	T
	839	820	-	TGTAGTTTATTTAG CACAGT	TTTATTTAG CA	T	T	T	A	T	T	T	A	G	C	A
	462	443	-	GATTGCTTAGACA GCCTCCC	CTTAGACA GCC	C	T	T	A	G	A	C	A	G	C	C
	122	103	-	CCGGGATGACTCA GCGCTTT	ATGACTCA GCG	A	T	G	A	C	T	C	A	G	C	G
ENSSSCG00000 001488 (GCLC)	419	400	+	AAATAGTGAGACT GCACAAG	GTGAGACT GCA	G	T	G	A	G	A	C	T	G	C	A
	190	171	+	CGAGGCTGACCCG GCTCCTC	CTGACCCG GCT	C	T	G	A	C	C	C	G	G	C	T
	779	760	-	ATGTATTTATTGTG CCCCT	TTTATTGT GCC	T	T	T	A	T	T	G	T	G	C	C
	699	680	-	AATGTGTGACAGA GCCATGA	GTGACAGA GCC	G	T	G	A	C	A	G	A	G	C	C
ENSSSCG00000 002623 (GSTA1)	633	614	+	GTGCCATTAAAGG GCAGAGC	ATTAAGG GCA	A	T	T	A	A	A	G	G	G	C	A
	986	967	-	CCCATGTGAACTT	GTGAACTT	G	T	G	A	A	C	T	T	G	C	A

				GCATTGA	GCA															
ENSSSCG00000 002626 (GSTA1)	458	439	+	TACCACTTAATGA GCATTTT	CTTAATGA GCA	C	T	T	A	A	T	G	A	G	C	A				
ENSSSCG00000 022742 (PRDX6)	926	907	-	CTGGTCTGAGAAA GCCTCTG	CTGAGAAA GCC	C	T	G	A	G	A	A	A	G	C	C				
	213	194	-	ACTCAATGACGTC GCCCTCT	ATGACGTC GCC	A	T	G	A	C	G	T	C	G	C	C				
ENSSSCG00000 026759 (HMOX1)	363	344	-	CCTGGATGAGAGA GCCTGGG	ATGAGAGA GCC	A	T	G	A	G	A	G	A	G	C	C				
	190	171	-	GGAATGTTACTAT GCGATCC	GTTACTAT GCG	G	T	T	A	C	T	A	T	G	C	G				
ENSSSCG00000 004454 (ME1)	484	465	+	CCAGGATTAATAT GCTACTC	ATTAATAT GCT	A	T	T	A	A	T	A	T	G	C	T				
	400	381	+	TTTTGTTTACATAG CAAATT	TTTACATA GCA	T	T	T	A	C	A	T	A	G	C	A				
ENSSSCG00000 010853 (EPHX1)	371	352	-	TCTTAATTAGGAT GCAAGAG	ATTAGGAT GCA	A	T	T	A	G	G	A	T	G	C	A				
	86	67	-	TGATTTTTACCTTG CATAAG	TTTACCTTG CA	T	T	T	A	C	C	T	T	G	C	A				
ENSSSCG00000 021408 (TKT)	141	122	+	AGGGACTGAACCT GCAACTT	CTGAACCT GCA	C	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A				
	665	646	-	CTGCAGTGAAGAT GCAAGTC	GTGAAGAT GCA	G	T	G	A	A	G	A	T	G	C	A				
	457	438	-	TACGCCTTACGGG GCCCTCA	CTTACGGG GCC	C	T	T	A	C	G	G	G	G	C	C				
ENSSSCG00000 010056 (GGT1)	736	717	-	AGGTTCTTAACCT GCCGAAC	CTTAACCT GCC	C	T	T	A	A	C	C	T	G	C	C				
	531	512	-	TTTTTTTTAAATGG CTGAAC	TTTAAATG GCT	T	T	T	A	A	A	T	G	G	C	T				
ENSSSCG00000 028739 (CEBPB)	854	835	+	GTGGTCTGAGGGG GCGGGCG	CTGAGGG GGCG	C	T	G	A	G	G	G	G	G	C	G				
	120	101	+	CAGGCGTGACGCA GCCGTTG	GTGACGCA GCC	G	T	G	A	C	G	C	A	G	C	C				
	96	77	-	GGTTATTTATAAG GCGGGCC	TTTATAAG GCG	T	T	T	A	T	A	A	G	G	C	G				
ENSSSCG00000 012847 (TALDO1)	499	480	+	GAGACGTGAGGT GGCTTTAA	GTGAGGTG GCT	G	T	G	A	G	G	T	G	G	C	T				
ENSSSCG00000 014540 (FTH1)	480	461	+	TTTGCATTACCAG GCACCTC	ATTACCAG GCA	A	T	T	A	C	C	A	G	G	C	A				
	932	913	-	AGAAGCTGAAGGC GCGGAAC	CTGAAGGC GCG	C	T	G	A	A	G	G	C	G	C	G				
	848	829	-	CCATTTTGAATG GCCGATC	TTGAAATG GCC	T	T	G	A	A	A	T	G	G	C	C				
ENSSSCG00000 021067 (BLVRV)	219	200	+	AGTGTGTGACACT GCATGTG	GTGACACT GCA	G	T	G	A	C	A	C	T	G	C	A				
	112	93	+	TGAGTGTGACGGT GCAGGAT	GTGACGGT GCA	G	T	G	A	C	G	G	T	G	C	A				

	84	65	+	TTCATGTGAGTGT GCAACTG	GTGAGTGT GCA	G	T	G	A	G	T	G	T	G	C	A
	967	948	-	GTCCTGTGACTCC GCGGCCT	GTGACTCC GCG	G	T	G	A	C	T	C	C	G	C	G
ENSSSCG00000 001723 (PLAG2G7)	979	960	-	TTAAGCTGAAACG GCTGCTC	CTGAAACG GCT	C	T	G	A	A	A	C	G	G	C	T
ENSSSCG00000 012136 (PIR)	404	385	+	ATCATTGATCCAG CAATCC	TTGATCCA GCA	T	T	G	A	T	C	C	A	G	C	A
	767	748	-	TTGTAAGTAAACA GCTGCGC	CTGAAACA GCT	C	T	G	A	A	A	C	A	G	C	T
	437	418	-	GTTTTTGGAGGAT GCTCCAT	TTGAGGAT GCT	T	T	G	A	G	G	A	T	G	C	T
	292	273	-	GGACATTTAGGTT GCTTCCA	TTTAGGTT GCT	T	T	T	A	G	G	T	T	G	C	T
	153	134	-	TCTGACTGACTGC GCTTCCAC	CTGACTGC GCT	C	T	G	A	C	T	G	C	G	C	T
Consensus						n	T	G T	A	n	n	n	n	G	C	n

9.3 Composição dos meios definidos usados para o crescimento de micoplasmas suínos.

Componente	Concentração			
	Meio Definido (Yus <i>et al.</i> , 2009)	CMRL-1066 (Invitrogen)	CMRL+	CMRL+/ Pep
BASAL				
Na ₂ HPO ₄	2 mM	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	1.01 mM	1.01 mM	1.01 mM
NaHCO ₃	-	26.19 mM	26.19 mM	26.19 mM
NaCl	100 mM	117.22 mM	117.22 mM	117.22 mM
KCl	5 mM	5.33 mM	5.33 mM	5.33 mM
MgSO ₄	0.5 mM	0.813 mM	0.813 mM	0.813 mM
CaCl ₂	0.2 mM	1.8 mM	1.8 mM	1.8 mM
Acetato de sódio-3H ₂ O	-	0.61 mM	0.61 mM	0.61 mM
Glucuronato de sódio	-	0.0178 mM	0.0178 mM	0.0178 mM
FONTES DE CARBONO				
glicose	10 g/L	1 g/L	2 g/L	2 g/L
glicerol	0.5 g/L	-	0.5 g/L	0.5 g/L
AMINOÁCIDOS				
alanina	4 mM	0.281 mM	0.281 mM	0.281 mM
arginina	4 mM	0.332 mM	0.332 mM	0.332 mM
aspartato	-	0.226 mM	0.226 mM	0.226 mM
asparagina	4 mM	-	4 mM	4 mM
cisteína	4 mM	1.65 mM	1.65 mM	1.65 mM
cistina	-	0.0833 mM	0.0833 mM	0.0833 mM
glutamato	-	0.51 mM	0.51 mM	0.51 mM
glutamina	4 mM	-	4 mM	4 mM
glicina	4 mM	0.667 mM	0.667 mM	0.667 mM
histidina	4 mM	0.0952 mM	0.0952 mM	0.0952 mM
isoleucina	4 mM	0.153 mM	0.153 mM	0.153 mM
leucina	4 mM	0.458 mM	0.458 mM	0.458 mM
lisina	4 mM	0.383 mM	0.383 mM	0.383 mM
metionina	8 mM	0.101 mM	0.101 mM	0.101 mM
fenilalanina	1 mM	0.152 mM	0.152 mM	0.152 mM
hidroxi L-prolina	-	0.0763 mM	0.0763 mM	0.0763 mM
L-prolina	4 mM	0.348 mM	0.348 mM	0.348 mM
serina	1 mM	0.238 mM	0.238 mM	0.238 mM
treonina	4 mM	0.252 mM	0.252 mM	0.252 mM
triptofano	0.5 mM	0.049 mM	0.049 mM	0.049 mM
tirosina	0.5 mM	0.221 mM	0.221 mM	0.221 mM
valina	8 mM	0.214 mM	0.214 mM	0.214 mM
BASES				
guanina	20 mg/L	-	20 mg/L	20 mg/L
uracila	20 mg/L	-	20 mg/L	20 mg/L
timina	10 mg/L	10 mg/L	11 mg/L	11 mg/L
citidina	20 mg/L	-	20 mg/L	20 mg/L

adenina	20 mg/L	-	20 mg/L	20 mg/L
2'desoxiadenosina	-	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
2'desoxiguanosina	-	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
2' desoxicitidina	-	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
5'-metil-desoxicitidina	-	0,1 mg/L	0,1 mg/L	0,1 mg/L
uridina 5'trifosfato	-	1 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
VITAMINAS and COFATORES				
ácido ascórbico	-	0.284 mM	0.284 mM	0.284 mM
biotina	-	0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L
niacinamida	-	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
ácido para-aminobenzóico	-	0.05 mg/L	0.05 mg/L	0.05 mg/L
espermina	0.1 mM	-	0.1 mM	0.1 mM
ácido nicotínico	1 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
tiamina	1 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L
piridoxal	1 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
cloridrato de piridoxina	-	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
ácido tiótico	0.2 mg/L	-	0.2 mg/L	0.2 mg/L
riboflavina	1 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L
colina	1 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L
ácido fólico	1 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L
i-Inositol	-	0.05 mg/L	0.05 mg/L	0.05 mg/L
coenzima A/ pantotenato	1 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L
coenzima A	-	2.5 mg/L	2.5 mg/L	2.5 mg/L
NAD	-	7 mg/L	7 mg/L	7 mg/L
FAD	-	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
NADP	-	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
LIPÍDEOS				
colesterol	20 mg/L	0,2 mg/L	0,2 mg/L	0,2 mg/L
ácido palmítico	10 mg/L	-	10 mg/L	10 mg/L
ácido oleico	12 mg/L	-	12 mg/L	12 mg/L
ácido linoleico	10 mg/L	-	10 mg/L	10 mg/L
BSA	2 g/L	-	2 g/L	2 g/L
OUTROS				
HEPES	50 mM	-	50 mM	50 mM
penicilina	1000 U/mL	-	-	-
vermelho de fenol	2.5 mg/L	20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L
Tween 80	-	5 mg/L	5 mg/L	5 mg/L
Glutaciona (reduzida)	-	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
Co-carboxilase	-	1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Etanol	0.4% final com lipídeos	0.4% final com lipídeos	0.4% final com lipídeos	0.4% final com lipídeos
pH	7.8	7.8	7.8	7.8

9.4 – Trabalho publicado durante o doutorado:

Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling

Mariana G. Ferrarini^{1,2,6}, Franciele M. Siqueira², Scheila G. Mucha², Tony L. Palama^{3,9}, Élodie Jobard³, Bénédicte Elena-Herrmann^{3,7}, Ana T. R. Vasconcelos⁴, Florence Tardy^{5,8}, Irene S. Schrank², Arnaldo Zaha^{2*§} & Marie-France Sagot^{1,6*§}.

SGM participou no desenvolvimento e teste de meios definidos para cultivo de micoplasmas do trato respiratório suíno.

¹ ERABLE, INRIA, 43, Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France.

² Cbiot, UFRGS, Av Bento Gonçalves, 9550, Porto Alegre, Brazil.

³ Université de Lyon, Institut de Sciences Analytiques (CNRS, ENS Lyon, Université Lyon 1), 5, Rue de La Doua, Villeurbanne, France.

⁴ Laboratório Nacional de Computação Científica, Av Getúlio Vargas, 333, Petrópolis, Brazil.

⁵ Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, 31, Av Tony Garnier, Lyon, France.

⁶ Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université de Lyon, 43, Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France.

⁷ Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Département d'Oncologie médicale, 28 rue Laënnec, Lyon, France.

⁸ Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, 1 Avenue Bourgelat, Marcy L'Étoile, France.

⁹ Current address: LISBP – INSA Toulouse, Toulouse, France.

§ Equal contributions.

* Correspondence authors: zaha@cbiot.ufrgs.br; marie-france.sagot@inria.fr

Artigo publicado na revista *BMC Genomics*.

O artigo está completamente reproduzido a seguir, com a numeração original das páginas mantidas. O material suplementar pode ser encontrado *online*:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866288/>

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling

Mariana G. Ferrarini^{1,2,6}, Franciele M. Siqueira², Scheila G. Mucha², Tony L. Palama^{3,9}, Élodie Jobard³, Bénédicte Elena-Herrmann^{3,7}, Ana T. R. Vasconcelos⁴, Florence Tardy^{5,8}, Irene S. Schrank², Arnaldo Zaha^{2*†} and Marie-France Sagot^{1,6*†}

Abstract

Background: The respiratory tract of swine is colonized by several bacteria among which are three *Mycoplasma* species: *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis*. While colonization by *M. flocculare* is virtually asymptomatic, *M. hyopneumoniae* is the causative agent of enzootic pneumonia and *M. hyorhinis* is present in cases of pneumonia, polyserositis and arthritis. The genomic resemblance among these three *Mycoplasma* species combined with their different levels of pathogenicity is an indication that they have unknown mechanisms of virulence and differential expression, as for most mycoplasmas.

Methods: In this work, we performed whole-genome metabolic network reconstructions for these three mycoplasmas. Cultivation tests and metabolomic experiments through nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) were also performed to acquire experimental data and further refine the models reconstructed *in silico*.

Results: Even though the refined models have similar metabolic capabilities, interesting differences include a wider range of carbohydrate uptake in *M. hyorhinis*, which in turn may also explain why this species is a widely contaminant in cell cultures. In addition, the myo-inositol catabolism is exclusive to *M. hyopneumoniae* and may be an important trait for virulence. However, the most important difference seems to be related to glycerol conversion to dihydroxyacetone-phosphate, which produces toxic hydrogen peroxide. This activity, missing only in *M. flocculare*, may be directly involved in cytotoxicity, as already described for two lung pathogenic mycoplasmas, namely *Mycoplasma pneumoniae* in human and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in ruminants. Metabolomic data suggest that even though these mycoplasmas are extremely similar in terms of genome and metabolism, distinct products and reaction rates may be the result of differential expression throughout the species.

Conclusions: We were able to infer from the reconstructed networks that the lack of pathogenicity of *M. flocculare* if compared to the highly pathogenic *M. hyopneumoniae* may be related to its incapacity to produce cytotoxic hydrogen peroxide. Moreover, the ability of *M. hyorhinis* to grow in diverse sites and even in different hosts may be a reflection of its enhanced and wider carbohydrate uptake. Altogether, the metabolic differences highlighted *in silico* and *in vitro* provide important insights to the different levels of pathogenicity observed in each of the studied species.

Keywords: *Mycoplasma*, *Mollicutes*, Metabolic network, Metabolism, Whole-genome metabolic reconstruction, Hydrogen peroxide

*Correspondence: zaha@cbiot.ufrgs.br; marie-france.sagot@inria.fr

†Equal contributors

²CBiot, UFRGS, Av Bento Goncalves, 9500 Porto Alegre, Brazil

¹ERABLE, Inria, 43, Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The respiratory tract of swine is colonized by several bacteria, among which are three common *Mycoplasma* species: *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, and *Mycoplasma hyorhinis* [1–3]. Even though little information is available concerning the prevalence of bacteria in healthy lungs, these three *Mycoplasma* species have been isolated from the respiratory tract of both healthy and diseased pigs [4–6].

While *M. flocculare* is usually described as a commensal bacterium [7], *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* are considered pathogenic. Enzootic pneumonia, caused by *M. hyopneumoniae*, is widespread in pig populations and is considered a major cause of economic loss in the pig industry [8]; *M. hyorhinis* is frequently present in cases of polyserositis and arthritis and *M. flocculare* has high prevalence in swine herds worldwide, but up to date, no disease has been *per se* associated with this species [7]. In addition to these mycoplasmas, *Mycoplasma hyosynoviae*, the primary agent of non-purulent arthritis, can occasionally colonize in the lower respiratory tract when pneumonic lesions pre-exist [9].

Besides mycoplasmal pneumonia, the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) has emerged as an economically significant respiratory disorder characterized by the slow growth, fever, cough, loss of appetite, lethargy and dyspnea in pigs [10, 11]. Even though many species are related to PRDC, it is essential to note that enzootic pneumonia caused by *M. hyopneumoniae* is by far the most costly disease in pig industry, and this bacteria is usually seen as an essential component to the successful establishment of a pathogenic community in the host [12]. Also, *M. hyopneumoniae* infections take longer to cause lesions and to be successfully eliminated than infections from other pathogens [10].

While mycoplasmal diseases in swine have been extensively studied, their causative agents have not been explored from a mathematical and computational point of view, mostly because their genome sequences were not available until recently [13–21]. Although recent studies have placed *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* and *M. hyorhinis* in close proximity within the hyopneumoniae clade by phylogenomic analysis [18], which corroborates with their high 16S rRNA sequence similarity [22], it is not yet clear what causes the specific pathogenicity or lack thereof in each of them. This elevated genomic resemblance combined with their different levels of pathogenicity is an indication that these species, as for most mycoplasmas, have unknown mechanisms of virulence and differential expression.

Pathogenic determinants such as adhesion to the host cell and evasion from the immune response have already been well-described in the literature for both *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* [23–27]. The presence of

a capsule in *M. hyopneumoniae* has been reported to be important for the interaction with the host cells in one single study [28]. Several studies also show that immunosuppressed animals experimentally infected with *Mycoplasma* species develop less severe microscopic lesions of pneumonia if compared to normal animals [29–31]. This means that it is possible in some cases that a strong response from the host immune system might be the primary cause of pathogenesis. However, up to date, it is not possible to draw any further conclusions due to lack of experimental data.

Even if these topics are of utter importance for understanding swine respiratory tract mycoplasmal diseases, what has yet to be better understood is the direct participation of metabolism in the development of them. For instance, although adhesion factors are related to pathogenicity, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* harbor similar sets of adhesion proteins [32], and have been shown to adhere to cilia in a similar way [33]. Thus, the ability of *M. hyopneumoniae* to cause disease if compared to *M. flocculare* might not be directly related to adhesion.

Furthermore, the genome sizes of *Mycoplasma* spp. range from 580 kb (*Mycoplasma genitalium*) to more than 1,358 kb (*Mycoplasma penetrans*), representing an important example of genome reduction (and minimal metabolism) during the evolutionary process. It is possible that in an initial symbiotic phase, the host provided a broad range of metabolites for these bacteria. This, together with the ability of the bacteria to uptake such compounds, made several activities dispensable for the bacterial life. Over the course of evolution, these bacteria would have lost some of the genes that became unnecessary for life in an environment conditioned by another genome [34].

In this way, we aimed at studying the reduced metabolism through genome-scale metabolic model reconstructions of *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* to better understand their different lifestyles. Based on the reconstructed networks, we propose that one of the mechanisms that may explain why *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae* are pathogenic while *M. flocculare* is not, is their ability to use glycerol as a carbon source, thus enabling the production of the highly toxic hydrogen peroxide. This trait may be directly involved in cytotoxicity, as already described for two lung pathogenic mycoplasmas, namely *Mycoplasma pneumoniae* in human [35] and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in ruminants [36].

Additionally, growth rates and fitness have been correlated in the past to virulence in several other organisms [37–39] and may be a key factor for the difference in pathogenicity among these three mycoplasmas. Indeed, the *in silico* models show that *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae* have extra sets of enzymes that may help

them overgrow the non-pathogenic species *M. flocculare*. *M. hyorhina* seems to have a wider carbohydrate uptake range, and probably for this reason is seen as a well-known contaminant of cell cultures [40]. *M. hyopneumoniae*, on the other hand, might use myo-inositol as a carbon source producing acetyl-coenzyme-A as a byproduct. This feature is of particular interest for the production of cofactor Coenzyme-A in this species, since most enzymes from the biosynthetic pathway are missing in all species.

Nevertheless, there is little metabolic experimental data available for the three species, which makes the reconstruction of a reliable metabolic model an extremely time-consuming work. Together with the fact that these mycoplasmas are generally grown in complex media, with high serum concentrations, we needed additional experimental data in order to compare the *in silico* reconstructed metabolic networks with the *in vivo* metabolic characteristics of the three species. For this reason, we also performed nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analyses to detect metabolites consumed and produced in both complex and defined media. These experiments corroborated with the reconstructed models and suggested two new features in particular: (i) the uptake of myo-inositol in *M. hyopneumoniae* might be related to a higher acetate production, and (ii) *M. hyorhina* showed a surprisingly reduced ability to convert pyruvate to acetate in the growth conditions used in this study. All these *in silico* and *in vivo* metabolic differences might influence the different levels of pathogenicity in each of the species studied here.

We present in this work the metabolic networks reconstructed from the annotated genomes of the three species and the comparison done with growth rates and metabolomic experiments performed *in vitro* in order to better understand the basis of the pathologies caused by these bacteria, which might help prevent their development in the future.

Methods

Modeling methods

Network reconstruction and refinement

We reconstructed the metabolic networks for all available strains isolated from swine so far of *M. hyopneumoniae* (pathogenic strains 232, 7422, 7448, 168 and non-pathogenic strains J and 168L), *M. hyorhina* (HUB-1, GDL-1, SK-76 and ATCC 17981 strain BTS7) and *M. flocculare* (ATCC 27716 and ATCC 27399). The semi-automated reconstructions were generated by the Pathologic tool from the Pathway Tools software [41] using the complete genomes available online. From now on, the species strains will be abbreviated according to Table 1.

Pathway Tools automatically associated genes with reactions, based on the annotation names, Gene Ontology (GO) terms and enzyme code (EC) numbers contained in the GenBank files. The software assembled reactions into

pathways by comparing them with the reference database, MetaCyc. The software automatically added missing reactions from the reference database to the model, creating many orphan reactions (reactions that do not have an enzyme associated). In a gapfilling step, we used the Pathway Hole Filler tool, included in the Pathway Tools software, to identify possible candidate genes associated with these orphan reactions. Orphan reactions in the metabolic network were allowed only to allow known functionalities of the organisms or biomass production in the reconstructed models. We incorporated the minimal number of orphan reactions into the models to avoid adding a behavior that was never described.

In our work, the refinement of the networks was made in a subsystems approach [42] simultaneously on all organisms. As a result of different genomic annotations, slightly different reactions arose throughout the automatic models. These reactions were checked for consistency, and after validation of only one of them, the duplicates were deleted. Gene-Protein-Reaction (GPR) associations were systematically validated or included based on experimental data, information provided by the Pfam functional domain database [43], synteny analysis (gene context) and reciprocal sequence homology (BLASTp) searches, using at first high E-value cutoffs of at least 10^{-10} [44]. Whenever no hits were achieved with these parameters, more relaxed parameters were assumed (E-value cutoffs of at least 10^{-5}). Homolog proteins with equivalent functional domains were assigned as isozymes to a particular reaction, while proteins with distinct functional domains were assigned as subunits of a multi-protein complex.

Non-metabolic reactions such as DNA polymerization, protein synthesis and RNA synthesis were explicitly deleted from the network but implicitly included in the biomass assembly. Generic reactions were either specified or excluded from the models. The resulting models were further refined in accordance with a detailed protocol from Palsson and Thiele [45]. Reactions were computationally balanced for mass and charge, while cofactor usage was determined based on literature data for closely related species [46–48]. Reaction directionality was thermodynamically checked and validated. Reaction directionality was determined based on the component contribution method [49, 50], which extends the group contribution method [51] and achieves a significant improvement in the accuracy of the estimations of standard Gibbs energies. An online search and calculation interface called eEquilibrator along with metabolite and reaction thermodynamic databases are available at [52, 53]. Heuristic rules were used to improve the directionality assignment.

We analyzed the network topology to identify compounds that were only produced or consumed in the network, the so-called dead-end metabolites (DEM). Whenever a DEM was found, we either (i) added or validated

Table 1 Selected species and strains, abbreviation, NCBI accession numbers and experimental availability of strains

Species	Strain	Accession number	Abbreviation	Pathogenicity level	Experimental availability ^{★^a}	Reference
<i>M. hyopneumoniae</i>	168	NC_017509	MHP_168	Pathogenic	NA	[16]
	168L	CP003131	MHP_168L	Attenuated	NA	[19]
	232	AE017332	MHP_232	Pathogenic	NA	[13]
	7422	NC_021831	MHP_7422	Pathogenic	Brazil	[18]
	7448	AE017244	MHP_7448	Pathogenic	Brazil	[14]
	J	AE017243	MHP_J	Attenuated	Brazil and France	[14]
	All Strains	NA	MHP	NA	NA	NA
<i>M. hyorhinis</i>	HUB-1	NC_014448	MHR_HUB1	Pathogenic	NA	[15]
	GDL-1	NC_016829	MHR_GDL1	NA ^{★^b}	NA	[17]
	SK-76	NC_019552	MHR_SK76	Pathogenic	NA	[20]
	ATCC 17981	ARTL0100000	MHR_17981	Attenuated	Brazil and France	NA ^{★^c}
	All Strains	NA	MHR	NA	NA	NA
<i>M. flocculare</i>	ATCC 27399	CP007585	MFL_27399	Commensal	France	[21]
	ATCC 27716	AFCG01000000	MFL_27716	Commensal	Brazil	[18]
	All Strains	NA	MFL	NA	NA	NA

Notes:

NA: Not available

^{★^a}: Strains available only in Brazil are protected strains which are property of the government and cannot be used outside authorised laboratories. Strains available in France were purchased from the ATCC repository; these strains were also available for testing in the laboratory in Brazil

^{★^b}: *M. hyorhinis* strain GDL-1 was retrieved from a contaminated cell line and, to our knowledge it has never been reported neither as pathogenic nor as an attenuated strain

^{★^c}: *M. hyorhinis* strain ATCC 17981 genome is available online but not published in any paper up to now. (source: <http://genomeportal.jgi.doe.gov/Mychy1/Mychy1.info.html>)

an orphan reaction to reconnect it to the rest of the network, or (ii) removed the reaction from the model when both substrate(s) and product(s) were disconnected from the network and/or did not affect the overall metabolism. Transporters were predicted at first from genome annotation using the Transport Identification Parser, from Pathway Tools [54]. Transporters were predicted mainly based on sequence similarity to other known transporters, since experimental data for the three mycoplasmas were not available. Specific transport reactions and exchange reactions required for production of biomass components were manually added to the final version of the networks.

Biomass composition and biomass equation

In order to simulate growth, we had first to estimate the average cell composition of these mycoplasmas (biomass composition). To this end, we used a general macromolecule mycoplasma cell composition from Razin and collaborators [55]. Depending on the species, the authors showed that the solid residue contained 54–62 % of proteins, 12–20 % of lipids, 3–8 % of carbohydrates, 8–17 % of RNA, and 4–7 % of DNA. The membranes comprised around 35 % of dry weight of the organisms and contained 47–60 % of proteins, 35–37 % lipids, 4–7 % carbohydrates and small amounts of DNA and RNA. Since

no information on metal ions and cofactors was available, we included them quantitatively based on the metabolic networks reconstructed for related mycoplasmas [46, 47]. Membrane and lipid components were added based on literature composition of the selected species. It is important to note that the only difference in composition between the species reported so far was related to the presence of glycolipids in *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*, which were reported to be absent in *M. hyorhinis* [56–58]. Based on the previous information, we assumed the following fractions of macromolecules: 55 % proteins, 15 % lipids, 6.88 % carbohydrates, 12 % RNA, 6 % DNA, and 5.12 % of ions and cofactors. To create a biomass elemental formula, we took into account the percentage contribution of each of the components to the overall cell. The biomass reaction represented the drain of these components into biomass production. It implicitly assembled DNA replication, RNA transcription, and protein synthesis into one single reaction. Amino acids were indirectly included in the biomass reaction: charged tRNAs were accounted as substrates and uncharged tRNAs as products. Growth and non-growth associated maintenance (GAM and NGAM) were estimated based on the literature and were manually added to the models [59, 60]. The details for the complete assembly of the biomass reaction can be found in Additional file 2.

Model validation and FBA analysis

The metabolic networks were exported as a mathematical Systems Biology Markup Language (SBML) models [61]. They were uploaded to the COBRA-toolbox v2.0 Matlab extension [62] for Flux Balance Analysis (FBA) testing. Minimum-maximum flux constraints were imposed based on literature information [46]. Growth simulations were achieved using biomass production as the FBA objective function.

Experimental methods

Swine mycoplasmas cultivation

Complex media comprised (i) Friis media [63] (available in Brazil), and (ii) a commercial mycoplasma broth (provided by Indicia Biotechnology, available in France). Defined media cultivation tests were performed in France and comprised (i) a medium described for *M. pneumoniae* strain 129 by Yus and collaborators (2009), and (ii) commercial media CMRL with no glutathione (Invitrogen). Since we had no information on metabolism of swine mycoplasmas, we decided to supplement the defined Yus medium with all amino acids (from now on the supplemented version will be referred to as Yus+). We also supplemented the CMRL-1066 medium with other peptone and/or other cofactors (from now on these will be referred to as CMRL+ and CMRL+/Pep). Information on the composition of all defined media is available in Additional file 1: Table S1. Cells were cultivated at 37 °C for different time periods, under gentle agitation (100 rpm).

Cell concentration estimation and viability by color changing units (CCU) measurement

Cell growth and viability was measured with triplicate time-matched samples of cells and culture media for CCU as described by Stemke and Robertson [64]. Viability of cells is visible by a change in medium color from red to yellow. For cell concentration measurements, the cultures were subjected to a series of 10-fold dilutions in complex media and 1 CCU/mL was defined as the highest dilution of cells able to change the medium color [65].

Samples for NMR spectroscopy

NMR was performed with complex Friis medium (with strains MHP_7448, MHP_J, MHR_17981 and MFL_27716) and defined Yus+ medium (with strains MHP_J, MHR_17981 and MFL_27716). The medium was collected at the following time intervals: 0 h, 8 h, 10 h, 24 h, 32 h, and 48 h for Friis medium and 0 h, 8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h and 72 h for Yus+ medium. Cells were separated from growth media through sedimentation at 3360 g for NMR analysis. Samples consisted of biological triplicates in complex medium and biological duplicates in defined medium. Since we had slight different time

intervals, care was taken by not directly comparing the results from different experiments.

NMR analysis

Sample preparation was as follows: 60 μ L of a mixture containing 1.25MKH₂PO₄ phosphate buffer (pH=7.4) in D₂O with 2 mM NaN₃ and 0.1 % trimethylsilyl propionate (TMSP) was added to 540 μ L supernatant samples. Both solutions were mixed thoroughly and 550 μ L were then transferred to 5 mm NMR tubes and sorted in 96-tubes racks.

All NMR experiments were carried out on a Bruker 800 MHz NMR spectrometer equipped with a 5 mm TXI probe and a SampleJet autosampler, enabling high-throughput data acquisition for large collections of samples. The temperature was controlled at 27 °C throughout the experiments, and the samples were kept refrigerated at 4 °C during a waiting time of less than 24 h in the autosampler, before the NMR analysis. Standard ¹H 1D NMR pulse sequence nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) with z-gradient and Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) with water presaturation (Bruker pulse program noesygpr1d and cpmgpr1d) were applied on each sample to obtain the corresponding metabolic profiles. A total of 128 transient free induction decays (FID) were collected for each experiment with a spectral width of 20 ppm. The relaxation delay was set to 4 s. The NOESY mixing time was set to 10 ms. The total acquisition time of each sample was 12 min 34 s. The CPMG spin-echo delay was set to 300 ms, for a total filter of 77 ms, allowing an efficient attenuation of the lipid and protein NMR signals. The 90° pulse length was automatically calibrated for each sample at around 10 μ s.

Data processing: All FIDs were multiplied by an exponential function corresponding to a 0.3 Hz line-broadening factor, prior Fourier transformation. 1H-NMR spectra were manually phased and referenced to the TSP signal ($\delta = -0.016$ ppm at pH 7.4) using Topspin 3.1 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany). Extraction of a data matrix for multivariate statistical analysis from the ¹H NMR profiles was done using the Statistics toolbox of AMIX (Bruker Biospin). Spectra were integrated from 0.3 to 10 ppm at a step of 0.01 ppm but excluding the regions of residual water at 4.68–4.88 ppm. No normalization of the intensity was performed. The resulting data matrix contains 947 NMR variables.

Multivariate data analysis: Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA) were performed using SIMCA-P 13 (Umetrics, Umea, Sweden) with scaling based on the Pareto method.

Metabolites identification and quantification: Metabolite identification was achieved by comparing spectra with databases such as HMDB [66]. Identification of the metabolites was further verified with homonuclear

and heteronuclear 2D NMR experiments such as $^1H-^{13}C$ HSQC, $^1H-^1H$ TOCSY and J-resolved experiments. Absolute quantification of the metabolites was performed using Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, Canada).

Results

Model reconstruction and refinement

Based on the published genomes of 6 strains of *M. hyopneumoniae*, 4 strains of *M. hyorhinis* and 2 strains of *M. flocculare*, we reconstructed 16 genome-scale metabolic models: one model for each strain separately, one for each species and a pan-reconstruction for all three species (Table 1). The semi-automated reconstructions were manually refined according to the description given in the “Methods” section.

The Pan-swine *Mycoplasma* network (representing the merge of all strains, and called pan-network) was initially composed by 829 reactions. Duplicate reactions arose from the fact that Pathway Tools is based only on the annotations contained in the GenBank files. We removed generic and duplicate reactions from the models and replaced them with the specific and validated ones. Non-metabolic reactions were also excluded at this point, along with absent capabilities of these mycoplasmas, such as heme, quinone or cytochrome dependent reactions [67]. The networks were also tested for the presence of DEM and the ability to produce all biomass precursors. DEMs were analyzed on a case-by-case manner. From initially 157 DEMs, 124 disconnected metabolites (along with 58 reactions) were excluded from the models: 14 DEMs came from 7 spontaneous reactions; 59 were carbohydrate substrates derived from wide range transport reactions and were not used by any other reaction in the network; 51 were excluded as they did not interfere with the overall metabolism and/or the enzyme had already been assigned to one or many other reactions. Orphan reactions were excluded unless they were essential for biomass growth. All excluded reactions (non-metabolic, generic, duplicated, orphan) and all DEMs (validated and excluded) are listed in Additional file 1: Tables S2c and S2d. It is interesting to point out that other unknown enzymes (or even *moonlight* enzymes) from these organisms may indeed use some of the excluded DEMs; however, since we have no experimental evidence at present, we could not assess their interference in the metabolic models.

The remaining DEMs consisted mainly of cofactors and biomass precursors (such as nucleotides, amino acids, fatty acids) disconnected from the rest of the network. They were solved along with the biomass precursor check; 141 reactions were added to allow growth: 1 biomass reaction, 14 enzymatic reactions, 1 drain-synthetic reaction, 105 transport reactions and 5 spontaneous reactions. Transport reactions were considered as such even

if an enzymatic activity was also present (i.e. the import of sugars with a concomitant phosphorylation of substrate). In order to correctly assign possible and specific transporters, we performed an extensive literature search and reciprocal BLAST alignments to characterized transporters in other species. These results have to be experimentally confirmed, since assignment of the correct substrate based only on sequence homology remains an open problem in genomic annotation.

We also changed inconsistencies of reversibility and cofactor usage. Even after all efforts, four DEMs still remained: TTP, hexulose-6-phosphate, deoxyinosine and xanthosine-5-phosphate. After the final addition of 101 exchange reactions, we ran FBA tests to check the consistency of all models. If a reaction was essential for biomass growth and no homolog gene was found in the genome, an orphan reaction was validated or added to the reconstruction for modeling reasons only. The resulting refined pan-network had a total of 457 reactions and 258 GPR associations. A comparison between the species models may be found in Fig. 1. These results indicate that all strains from all species are indeed metabolically similar.

The overall characteristics of each reconstruction can be seen in Table 2. A list of all reactions and metabolites added to the models along with the corresponding genes can be seen in Additional file 1: Table S2.

Biomass composition and biomass equation

The biomass equation drained all precursors (in their molar biological ratios) into biomass. Biomass composition according to the “Methods” section along with a detailed description of the assembly of the biomass reaction can be found in Additional file 1: Table S3 and Additional file 2. Considering the percentage contribution of each of the components to the overall cell, an approximate biomass elementary composition for *M. hyorhinis* was computed as follows: $CH_{1.57}O_{0.36}N_{0.21}P_{0.02}S_{0.02}$,

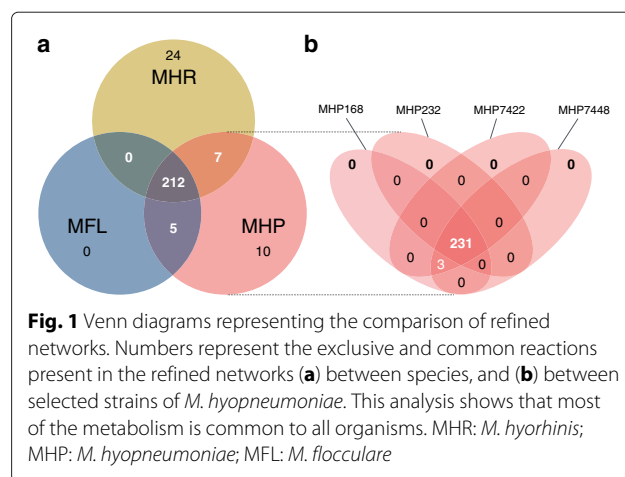


Fig. 1 Venn diagrams representing the comparison of refined networks. Numbers represent the exclusive and common reactions present in the refined networks (a) between species, and (b) between selected strains of *M. hyopneumoniae*. This analysis shows that most of the metabolism is common to all organisms. MHR: *M. hyorhinis*; MHP: *M. hyopneumoniae*; MFL: *M. flocculare*

Table 2 Characteristics of reconstructed models from different strains and species

Organism	Model name	Number of genes in model	Number of GPRs * ^a	Enzymatic reactions * ^b	Transport reactions * ^b	Spontaneous reactions * ^c	Total number of reactions * ^d
MHP_232	iMF170	170	233	208	111	9	426
MHP_168	iMF172a	172	234	209	111	9	427
MHP_168L	iMF172b	172	234	209	111	9	427
MHP_7422	iMF168	168	234	209	111	9	427
MHP_7448	iMF171	171	234	209	111	9	427
MHP_J	iMF172c	172	234	209	111	9	427
MHP	iMFmhp	NA * ^e	234	209	111	9	427
MHR_HUB1	iMF177	177	239	209	111	6	423
MHR_GDL1	iMF175	175	242	210	113	6	426
MHR_SK76	iMF181	181	243	211	113	6	427
MHR_17981	iMF182	182	243	211	113	6	427
MHR	iMFmhr	NA * ^e	243	211	113	6	427
MFL_27399	iMF159	159	217	196	105	9	401
MFL_27716	iMF157	157	217	196	105	9	401
MFL	iMFmfl	NA * ^e	217	196	105	9	401
Pan-Network	iMFpan	NA * ^e	258	230	117	9	457

Notes:

*^a: GPRs are gene-proteins-reaction associations present in each genome. For iMFmhp, iMFmhr, iMFmfl and iMFpan that account for more than one species, we added a GPR to the species model when any of the strains harbored a gene responsible for a specific activity

*^b: Reactions were considered as transport reactions even if the transporter was capable of performing a concomitant enzymatic activity

*^c: Spontaneous reactions included diffusion of small molecules and spontaneous conversions

*^d: Total number of reactions included also all exchange reactions needed for the mathematical modeling

*^e: Genes in the pan-network and species models were added synthetically (one per reaction), to enable a reaction essentiality analysis

with traces of calcium, chlorum, cobalt, copper, iron, potassium, magnesium, manganese, molibdenium and zinc and molecular weight (MW) on a C-mole basis of 23.89 g/C – mol. We had a slightly different composition for *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*: $CH_{1.59}O_{0.34}N_{0.21}P_{0.16}S_{0.02}$, with the previously mentioned trace compounds and MW on a C-mole basis of 23.31 g/C – mol.

Metabolism of *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*

Similar to most *Mycoplasma* species studied so far [46–48], all reconstructed networks exhibit low connectivity due to the simplicity of the biological model. Out of the 457 reactions in the final pan-network, 258 had in at least one species a GPR association. From these, 212 were common to all species (Fig. 1). The overall metabolism from the models reconstructed consisted of 11 distinct subsystems: amino sugar metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism (further broken down into: glycolysis, pentose phosphate pathway, ascorbate degradation, myo-inositol degradation, general carbohydrate metabolism, and pyruvate metabolism), cofactor metabolism, lipid metabolism, and nucleotide metabolism (Fig. 2 for pan-network; the number of GPR associations for each species can be seen in Additional

file 1: Tables S4a and S4b). While all enzymes were present in glycolysis, most metabolic pathways had major enzyme gaps. In the product and cofactor metabolism, for instance, gaps accounted for up to 50 % of the reactions. *M. flocculare* was the only species that did not show any exclusive metabolic activities in the models, although this could not be verified in vivo due to lack of biochemical studies for this species. *M. hyopneumoniae* had 10 exclusive reactions, linked to the myo-inositol metabolism and alcohol dehydrogenase activity. *M. hyorhinis* had 24 exclusive reactions; most of them corresponded to carbohydrate metabolism. A global model comparing each species enzymatic capabilities can be seen in Figs. 3 and 4. The complete list of metabolite abbreviations and EC numbers for these two figures can be found in Additional file 3.

Transporters

Transporter assignment was made *in silico* based on sequence similarity to known transporters. We were able to identify in all species complete putative ABC transporters for multidrug/toxin efflux and for import of sugars, oligopeptides, peptides, spermidine/putrescine, phosphonate/phosphate/thiamine, cobalt, manganese/zinc and glycerol. In the search of a possible nucleotide transporter, we came across with

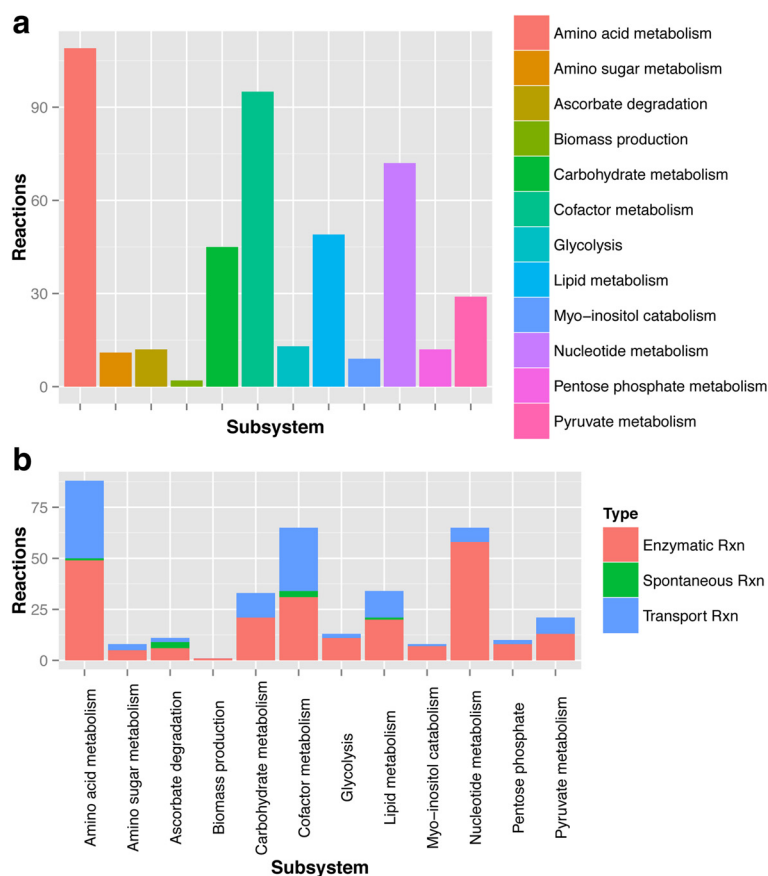


Fig. 2 Distribution of the model reactions in the subsystems. The 457 reactions present in the model iMFpan were separated into **(a)** biological subsystems and **(b)** further into reaction types, with the exclusion of exchange reactions in this analysis

an unpublished work from Lee [68] in which a system previously annotated as sugar ABC transporter was experimentally validated as involved in nucleoside uptake in *Mycoplasma bovis*. These results may be highly speculative, and need further verification, but we were able to find homolog genes in the genomes of all species. *M. hyopneumoniae* seems to have an extra ABC transporter proposed for myo-inositol and *M. hyorhinis* has a unique predicted ABC transporter for maltose/maltodextrins. Three complete phospho-transferase transport systems (PTS) were common to all species. Although specificity of PTS is difficult to ascertain, we have tried to compare conserved domains from validated PTS substrate-specific enzymes II (available in TransportDB [69]) and candidates from the three species. Genes coding enzyme I and phosphocarrier were found in all strains, except in MHR_HUB1. From sequence similarity and gene context we were able to annotate the correct gene. Based on these *in silico* predictions from domain retrieval, we propose the following: one PTS non-specific for sugar, one with specificity for fructose and another for mannitol. *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* also share two extra

complete systems: one possibly for ascorbate and one for N-acetylglucosamine (GlcNAc). *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae* seem to have an extra IIB component specific for glucose, and along with the other components of the general sugar PTS were proposed to form a complete glucose PTS.

The protein GlpU, coded by gene MPN241 in *M. pneumoniae*, was recently described to act on the uptake of glycerophosphodiester [70]. We found homologs of this gene in all strains of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* adjacent to the gene coding for the enzyme responsible for the metabolism of these substrates (GlpQ) [71]. In MHR_HUB1, this gene was annotated as a pseudo gene, but from gene context, we were able to validate it as GlpU. All species also possess several unspecific amino acid permeases, a glycerol facilitator protein (GlyF), which is thought to be less efficient than the glycerol ABC transporter (ABC-Gly) [35]) and a major facilitator protein (MIF) with unknown specificity. We could also find common transporters for cobalt and magnesium, chromate, magnesium, potassium, zinc and a cation ATPase. *M. hyorhinis* has two extra transport systems: one for

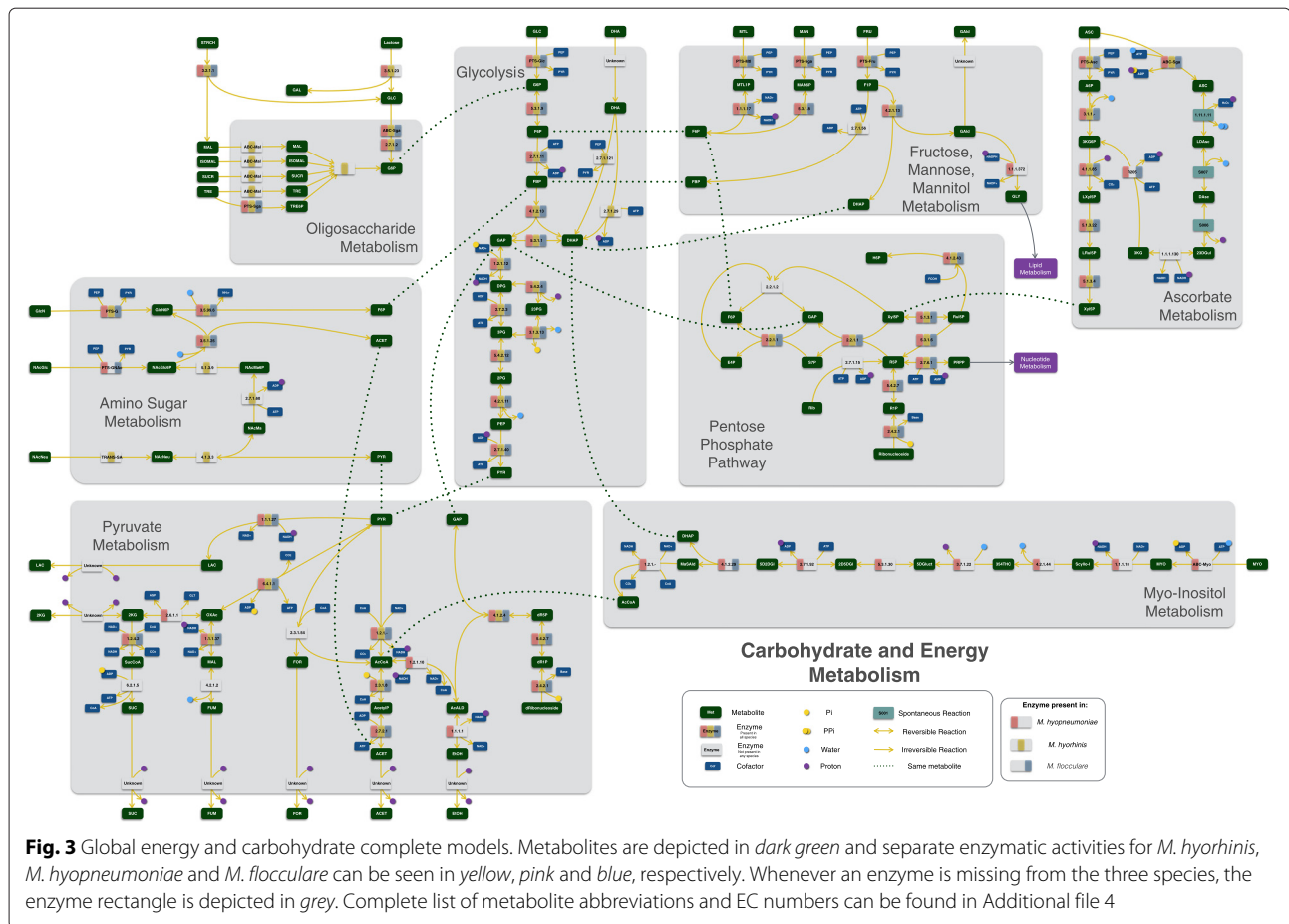


Fig. 3 Global energy and carbohydrate complete models. Metabolites are depicted in dark green and separate enzymatic activities for *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* can be seen in yellow, pink and blue, respectively. Whenever an enzyme is missing from the three species, the enzyme rectangle is depicted in grey. Complete list of metabolite abbreviations and EC numbers can be found in Additional file 4

sialic acid (also known as N-acetyl neuraminic acid) and one sodium/phosphate co-transporter. Details of the transport search throughout all species is summarized in Additional file 4.

Carbohydrate and energy metabolism

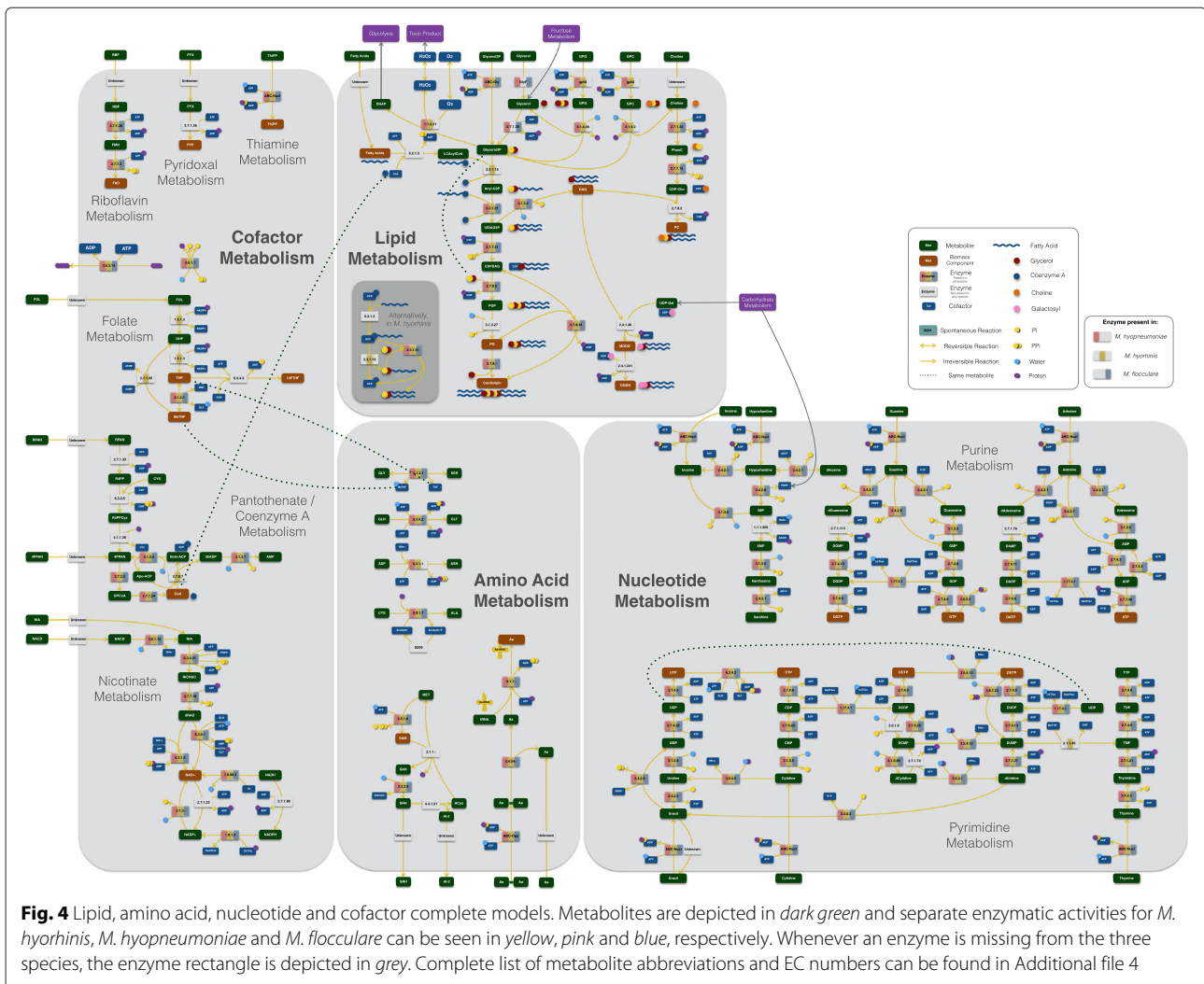
Glycolysis As previously described in [18], all genes for the glycolysis exist in all strains of all species. *M. hyorhinis* may be able to convert dihydroxyacetone (DHA) directly to dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) with the action of DHA kinase (2.7.1.29), but the mechanism of DHA uptake is not clear.

Pentose Phosphate In agreement with previously described literature [14, 18, 72], we found no enzymes for the oxidative branch of the pentose phosphate pathway in the studied species, turning ribulose-5-phosphate into a DEM. This problem was overcome by the assumption that the reaction ribulose-phosphate-3-epimerase (EC 5.1.3.1) can be reversible, as reported in *Lactobacillus casei* [73]. Out of the 11 reactions present in the final models, we found homologs for 9 in all species. Although a gene coding for transaldolase (EC 2.2.1.2) is missing in all species, we included this reaction in the models to prevent both

sedoheptulose-7-phosphate and erithrose-4-phosphate from becoming DEM.

Ascorbate Metabolism Only one enzyme is missing from the typical pathway: L-ascorbate-6-phosphate-lactonase (UlaG). This enzyme is responsible for the turnover of L-ascorbate-6-phosphate to 3-keto-gulonate-6-phosphate (EC 3.1.1.-). From the gene context, MHP_7448_0377 from MHP_7448 and its homologs from all other organisms may encode the missing enzyme. The gene was annotated as a conserved hypothetical protein with a proposed phosphotriesterase activity.

Uptake of other carbohydrates While the uptake of fructose, mannitol and mannose is similar in all species and they all can be fed into glycolysis as fructose-6-phosphate (F6P) and DHAP, *M. hyorhinis* has an extra set of enzymes enabling the conversion of fructose-1-phosphate into fructose-1,6-biphosphate by the action of 1-phosphofructokinase (EC 2.7.1.56). Only in *M. hyopneumoniae* the conversion of glyceraldehyde into glycerol might be possible through the moonlight activity of alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.372), although up to date



no experimental evidence can sustain that assumption. The presence of a unique transcriptional unit (TU) with carbohydrate metabolism-related genes in *M. hyorhinae* probably enables the uptake and metabolization of isomaltose (EC 3.2.1.10), maltose (EC 2.4.1.8), trehalose (EC 2.4.1.64 and EC 3.2.1.93) and sucrose (EC 3.2.1.48) into either glucose-6-phosphate or F6P. This may be related to the fact that *M. hyorhinae* can overgrow the other two species in several growth media.

Myo-inositol metabolism A TU for the myo-inositol catabolism is present in all *M. hyopneumoniae* strains, with the exception of the enzyme 5-dehydro-2-deoxy-phosphogluconate aldolase (IoJ, EC 4.1.2.29). The gene encoding this enzyme in other organisms is similar to the fructose-biphosphate aldolase (Fba) from glycolysis (EC 4.1.2.13). Since there are two copies annotated for Fba in *M. hyopneumoniae*, we proposed one of them as candidate for this activity based on sequence alignments with

both genes from *Bacillus subtilis*. Inositol can be used as a carbon source and also produces acetyl coenzyme-A (AcCoA), which can be a source of cofactor coenzyme-A (CoA).

Amino sugar metabolism *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* models could uptake and convert GlcNAc to N-acetyl-glucosamine-6-phosphate (GlcNAc6P); *M. hyorhinae* models imported sialic acid and converted it to GlcNAc6P in three steps that are unique to *M. hyorhinae* (EC 4.1.3.3, EC 2.7.1.60, EC 5.1.3.9). At first, the genes coding for these three enzymes were absent from MHR_HUB1 and MHR_GDL1. However, based on chromosome alignment and synteny with other genes, we were able to find the regions and correctly annotate all genes.

Pyruvate metabolism Out of fifteen enzymatic reactions in this pathway, only three were not found in any organism. Conversion of pyruvate to lactate and acetate were

possible in all species. From literature data, we knew that *M. hyopneumoniae* was able to produce oxaloacetate, malate and 2-oxoglutarate (2KG) [74, 75]. Decarboxylation of 2KG to succinyl coenzyme-A (SucCoA) has been previously reported in *M. hyorhinis* extracts [76]. Although we did not find any candidate for the activity of aspartate transaminase (EC 2.6.1.1), gap-filling proposed that this activity could be performed by the pyruvate dehydrogenase complex. Moreover, Cordwell and collaborators [77] suggested that in *Mollicutes* lactate dehydrogenase (Ldh, EC 1.1.1.27) could also function as malate dehydrogenase (Mdh, EC 1.1.1.37). *M. hyopneumoniae* is the only organism among the three to have a gene coding for an alcohol dehydrogenase, probably enabling the turnover of AcCoA to acetaldehyde (EC 1.2.1.1 0) and ethanol (EC 1.1.1.1). Conversion of pyruvate to formate by pyruvate formate-lyase (EC 2.3.1.54), malate to fumarate by fumarate hydratase (EC 4.2.1.2) and SucCoA to succinate by succinyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.5) were added to the models in a final step to accommodate the results from the metabolomics experiments.

Lipid metabolism

The lipid metabolism in the models of the three species included the uptake of glycerol, choline, glycerophosphodiester and fatty acids to the production of the biomass precursors cardiolipin, 1,2-diacyl-sn-glycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine and galactosyl-diacylglycerols (except in *M. hyorhinis*). Extracellular cholesterol and sphingomyelin were incorporated unmodified directly into biomass. While *M. hyopneumoniae* seems to have four different ways to uptake and metabolize glycerol (ABC-Gly, GlyE, GlpU and directly from glyceraldehyde) *M. hyorhinis* lacks one and *M. flocculare* lacks two of them (Fig. 4). The turnover of glycerol-3-phosphate into DHAP by the action of glycerol-3-phosphate oxidase (GlpO, EC 1.1.3.21) allows the usage of glycerol as the sole carbon source, with the production of highly toxic hydrogen peroxide. This was only possible in the *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae* models.

The enzyme responsible for the turnover of glycerol-3-phosphate into acyl-sn-glycerol-3-phosphate (glycerol-3-phosphate 1-O-acyltransferase, EC 2.3.1.15) was found only in the genomes of *M. hyorhinis*. Although this can be seen as a possible difference between the species, we had to add the reaction to the models from the other species to enable growth. It is possible that the other two species import this metabolite directly from the media, however further experiments are required to confirm this hypothesis. No homologs for the enzyme that produces phosphatidylglycerol (phosphatidylglycerophosphatase, EC 3.1.3.27) were found; however, all *Mollicutes* definitely synthesize this metabolite, and hence must use a hitherto undetected enzyme for this step [78].

The acyl-carrier protein (ACP) was only found in the genomes of *M. hyorhinis* and may act as a fatty acid and CoA donor in these organisms. Orphan reactions for the production of glycolipids (EC 2.4.1.46 and EC 2.4.1.241) were added to models for *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* based on the presence of these metabolites in vivo [56].

Amino acid metabolism

The import of amino acids was added in two forms: oligopeptide import and cleavage or single amino acid import. tRNA charging accounts for most of the reactions in this pathway (23 reactions). Production of the biomass precursor S-adenosyl-methionine from methionine is possible in all strains (methionine adenosyltransferase, EC 2.5.1.5). Moreover, since the enzyme adenosylhomocysteine nucleosidase (EC 3.2.2.9) is present in all species, we added two reactions to restore connectivity between these two subpathways (EC 2.1.1.- and EC 4.4.1.21). This addition resulted in the production of two metabolites essential for quorum sensing and cell communication in other species: S-rybosyl-homocysteine and autoinducer-2.

Nucleotide metabolism

The mycoplasmas in this study cannot synthesize *de novo* purines and pyrimidines; therefore, they have only salvage pathways and interconversions to supply the cell with nucleic acid precursors. The three species have the same enzymatic capabilities, except for the presence of thymidylate synthetase (EC 2.1.1.46) in *M. hyorhinis*, which is also important for cofactor metabolism and is responsible for the conversion of dUMP and 5,10-methylene-tetrahydrofolate (MeTHF) to dTMP and dihydrofolate. Overall, the nucleotide metabolism consists in the uptake of guanine, adenine, uracil, thymine and cytidine and produces all deoxy-ribonucleotides (dATP, dCTP, dGTP, TTP) and ribonucleotides (ATP, CTP, GTP and UTP).

Cofactor metabolism

Around 60 % of the enzymes that comprise the cofactor metabolism of the reconstructed models were not found in any species. For instance, thiamine-pyrophosphate is imported unchanged directly into biomass, while pyridoxal is imported and converted to the cofactors pyridoxal-phosphate by the action of pyridoxal kinase (EC 2.7.1.36 missing in all species). From the pantothenate/coenzyme-A metabolism, we only found homologs for the conversion of 4'-phosphopantetheine into dephospho-coenzyme-A by pantetheine-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.3). Three forms of folate are incorporated to the biomass: MeTHF, 5,6,7,8-tetrahydrofolate and 10-formyl-tetra-hydrofolate. We assumed

that folate was imported and converted to these three biomass cofactors by: dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3, only present in *M. hyorhinis*), serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1, present in all species) and formate-tetrahydrofolate ligase (EC 6.3.4.3, missing in all species). This may also account for the better fitness of *M. hyorhinis* when compared to the other two species. Although no homologs for NAD kinase were found, two reactions were added (EC 2.7.1.23 and EC 2.7.1.86) to allow the presence of NADP and NADPH, which are cofactors for several essential reactions. The NADPH and NADH produced from the degradation of glucose and other carbohydrates are recycled by the action of two enzymes: NADH oxidase (hydrogen peroxide forming, EC 1.6.3.3) and thioredoxin disulfide-reductase (EC 1.8.1.9).

Mycoplasmas cultivation

We cultivated the three species of mycoplasmas in complex and defined media to gather experimental information and compare to *in silico* growth (Fig. 5). In the CMRL+ medium, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* remained viable only when peptone was present (CMRL+/Pep). The presence of peptone appeared to have a negative effect on *M. hyorhinis* growth, but more tests should be performed to verify this hypothesis. Yus+ medium did not allow proliferation in any species, but maintained cell concentration and viability even after 5 days of culture (if inoculated afterwards in complex media). These results are in agreement with a previous work performed by Bertin and colleagues [79] in *M. mycoides* subsp. *mycoides* that shows that CMRL-1066 contains all components to support cellular metabolism but not growth. Here, the supplemented versions CMRL+

or CMRL+/Pep allowed proliferation only for *M. hyorhinis* during the first 24 h of growth. It seems that after this period of time, one or more essential metabolites initially present were no longer available. By comparing the models reconstructed in this work with the media composition tested for the three species, it might seem plausible that key cofactors might not be delivered to mycoplasmas in the correct form. For example, thiamine pyrophosphate should be directly delivered to all species instead of its precursor thiamine, and pyridoxal-5-phosphate might be the cofactor of choice for the media composition in place of pyridoxal. A list of predicted biomass precursors from the models *versus* the actual precursors found in the Yus+ medium can be seen in Additional file 1: Table S5. This new proposed defined medium will be submitted in the near future to cultivation tests with *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*.

Metabolomics of swine mycoplasma

NMR analysis of the culture media was performed in order to detect possible differences in the metabolism of the three species. All data measured in defined and complex media can be seen in Additional file 1: Tables S6a and S6b.

The major differences in both complex and defined media were related to the metabolism of pyruvate (Fig. 6): *M. hyorhinis* produced higher quantities of pyruvate at the end of 48 h in complex medium. As a result, pyruvate conversion to acetate was detected in low quantities for this species in both media. *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*, on the other hand, produced higher amounts of acetate (this was even more pronounced for the growth of *M. hyopneumoniae* in complex medium). Low amounts

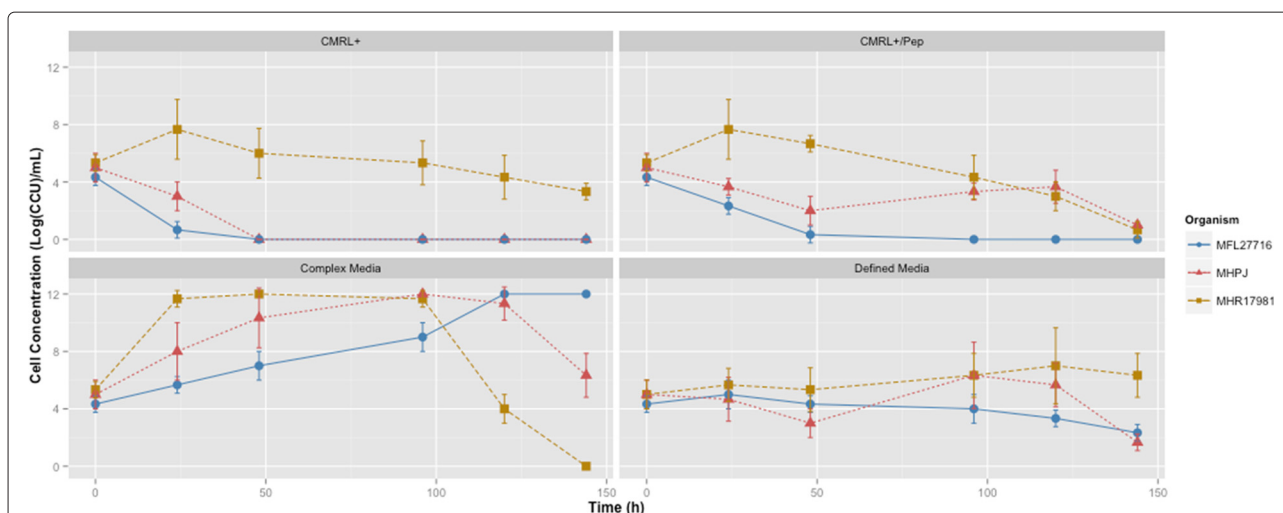
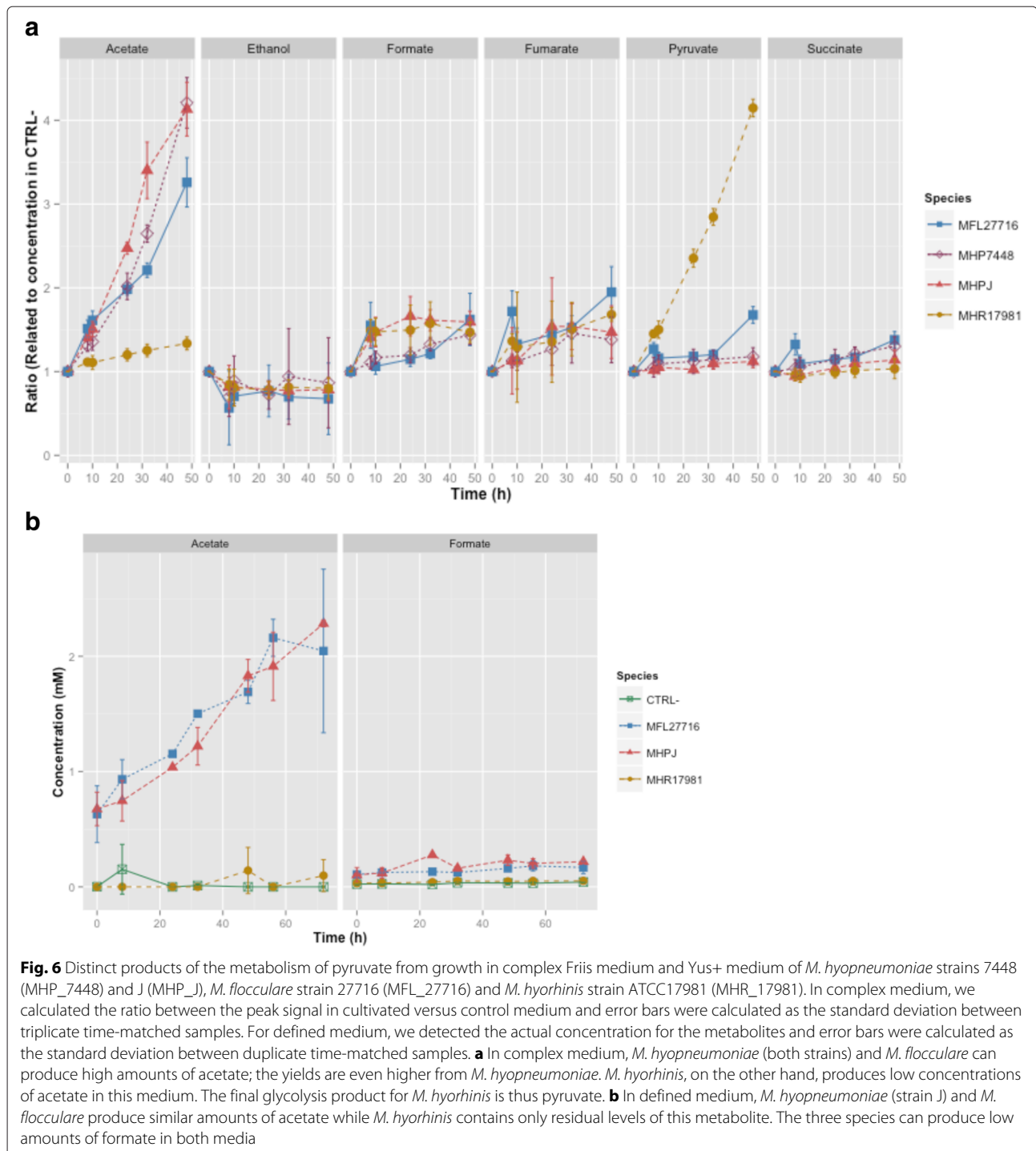


Fig. 5 Cultivation curves in defined and complex media by species. Cell concentrations were estimated by the CCU method and error bars were calculated as the standard deviation between triplicate time-matched samples. As expected, the three species had better growth rates in the complex medium than in defined media. *M. hyopneumoniae* strain J (MHP); *M. flocculare* strain 27716 (MFL); *M. hyorhinis* strain ATCC17981 (MHR)



of formate, fumarate and succinate were also detected, and this indicates the presence of genes encoding the enzymes pyruvate formate-lyase (EC 2.3.1.54), fumarate hydratase (EC 4.2.1.2) and succinyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.5) in these genomes. As previously mentioned, all models were thus modified to accommodate these activities. Formate production seems to be independent from

acetate production in *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*. However, the similar low concentrations of acetate and formate in both growth media from *M. hyorhinis* might be an indication that both are produced concomitantly by the action of pyruvate formate-lyase (EC 2.3.1.54), phosphate acetyl-transferase (EC 2.3.1.8) and acetate kinase (EC 2.7.2.1).

To check if the lower concentrations of acetate were a result of an impaired activity of the pyruvate dehydrogenase complex in *M. hyorhinae*, we compared the predicted proteins PdhA, PdhB, PdhC and PdhD from all species. The known active sites of ODP2 (homolog of PdhC) and OLDH1 (homologs to PdhC and PdhD respectively) from *Bacillus subtilis* were analyzed in search for a possible mutation. No active sites have been described for PdhA and PdhB so far, but the enzymes for all three swine mycoplasmas do not present significant differences. Although not all active sites from PdhD seem to exist in mycoplasmas, all predicted proteins from the species analyzed (including *M. genitalium* and *M. pneumoniae*) are similar in terms of active sites, when these are present. The only difference between *M. hyorhinae* and the other two species was found in PdhC, in the protein portion related to the binding to PdhA and PdhD. This portion is the most variable between the species. An enzyme characterization should be made in order to verify if this complex is not active in this species, or if it is responsible for another unforeseen activity.

The presence of myo-inositol in swine serum [80] might be directly related to the higher production of acetate in the growth of *M. hyopneumoniae* in complex medium, if compared to *M. flocculare*. Since the myo-inositol pathway produces AcCoA, the recovery of a molecule of CoA from myo-inositol is possible and may be directly linked to the production of acetate. Since the myo-inositol catabolic pathway is one of the few distinctions between the metabolic models of *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*, it is possible to assume that the differences in acetate concentration in vitro may indeed arise from the ability of *M. hyopneumoniae* to uptake myo-inositol. Indeed, when no source of myo-inositol is present (defined medium), no difference in the concentration of acetate is observed for these two species.

The analysis of the amino acid uptake was not trivial since both media contained peptone, which at first was not measured through the CPMG experiment but, in the course of time, was degraded into single amino acids, and thus changed the overall signal of the NMR spectra. To address this issue, we only took into account the Yus+ medium at a single time point after 72 h of growth. *M. hyorhinae* seemed to have lower concentrations of most amino acids at the end of the growth curve if compared either to the control medium or to the other species. This may be related to several factors, such as lower rates (in comparison to the other two species) of peptone degradation by membrane proteases or higher uptake rates of amino acids by *M. hyorhinae*. At this point, we could no longer verify which hypothesis is more suitable for this particular distinction, however, since peptone was not necessary for the maintenance of the viability of *M. hyorhinae* in the defined medium, it is possible that this

species may harbor transporters with higher specificity or effectiveness for single amino acids.

The results as concerns the other metabolites indicate for the three species the uptake of glucose and nucleotides.

Flux balance analysis (FBA)

FBA was used to check the properties and capabilities to produce detected metabolites by NMR spectra of all models (also during the reconstruction and refinement process). FBA simulations were performed with an *in silico* medium that contained all biomass precursors. Similarly to the in vitro growth results, in the presence of oxygen, acetate was the main product and NADH was recycled by the conversion of molecular oxygen into water. In the absence of oxygen (not tested in vitro), all models were able to grow but the main product became lactate. As expected, the availability of myo-inositol in the *in silico* medium allowed an alternative source of CoA and higher concentrations of acetate as a final product in the models for *M. hyopneumoniae*. Hydrogen peroxide production was linked to the metabolism of glycerol in both *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinae*, while the models for *M. flocculare* did not produce toxic levels of this metabolite. Since we have no information on gene essentiality for any species, we checked reaction essentiality in the pan-network. This means that we deleted individual reactions (all transport, enzymatic and spontaneous reactions) even if they did not have a GPR association. A total of 111 reactions (69 enzymatic, 37 transport, and 5 spontaneous reactions) were essential for growth in the pan-network (Additional file 1: Table S7).

Discussion

In this work, we created a metabolism as realistic as possible for the three known mycoplasmas present in the respiratory tract of swine. It is essential to point out that, although we had to include 30 % of orphan reactions in order to allow growth, we only used about half of the genomes of these organisms. The other half consists either of hypothetical or of conserved hypothetical proteins [18], which may in part fill the missing gaps of the models. The number of essential reactions in the pan-network in this work is not directly comparable to the number of indispensable genes predicted for *M. genitalium* (382 genes) or *M. pneumoniae* (310 genes) [81, 82]. Gene essentiality accounts for more than metabolic enzymes which means that proteins not included in our models, related to protein synthesis, DNA polymerization or RNA turnover, were not accounted for in the essential reactions of our models. If we added these proteins, we would possibly arrive at numbers closer to those of *M. genitalium* and *M. pneumoniae*. The lack of experimental information on gene essentiality is also a setback for the validation of the

models created here. Further experiments on this matter should help us better refine and complete the networks.

As for most of the *Mycoplasma* species studied [46–48], all reconstructed networks exhibit low connectivity due to the simplicity of the biological model. We were able to show in this work that the three swine mycoplasma species have similar metabolic capabilities, except for the metabolism of myo-inositol, amino sugar, carbohydrates and glycerol (Fig. 7). Overall, the methods used here enabled us to address some of the main problems caused by most automatic reconstruction methods which are the permissive inclusion of pathways and over prediction of capabilities. Annotation errors arise with the attribution of ambiguous or partial EC numbers [83, 84] and the propagation of these errors may then lead to many other ones. Thus, it is known that the prediction of GPR associations based only on name-matching and EC-codes is not sufficient to add confidence to a model [84]. When we decided to simultaneously refine the 12 models, we enhanced the confidence of each GPR association, by adding information on the synteny between the genomes, protein sequence alignments and phylogenetic distance between orthologs.

Our main objective was not only to reconstruct the metabolic models for *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*. We also wanted to compare the

metabolism of the three species and find possible links to virulence, host-colonization capacity and life-style. *M. hyorhinitis*, for instance, is not only a pathogen, but also a common contaminant in many mammalian cell cultures [85]. This may be explained by the wide range of carbohydrates which this organism can uptake and metabolize. This may be a crucial factor to the ability of *M. hyorhinitis* to grow in diverse sites inside the host [7] and even to invade other hosts and potentially develop cancer in humans [58, 86]. *M. hyopneumoniae* has been detected in other sites such as brain, liver and spleen [87, 88], but *M. flocculare* has never been detected outside of the respiratory tract of swine.

One may wonder what could explain this if both organisms are so similar. *M. hyopneumoniae* is up to date the only *Mycoplasma* species with sequenced genome that has the genes for the catabolism of myo-inositol. Myo-inositol is readily abundant in the bloodstream of mammalian hosts, and can be used as a secondary carbon source for energy production [89]. *Mycoplasma iguanae* has been described to produce acid from inositol [90]. However, there is no available complete genome sequence for this organism, making impossible any comparison of the genes involved in this pathway. Although at this point we cannot confirm that this pathway is functional in *M. hyopneumoniae*, the NMR results we obtained suggest

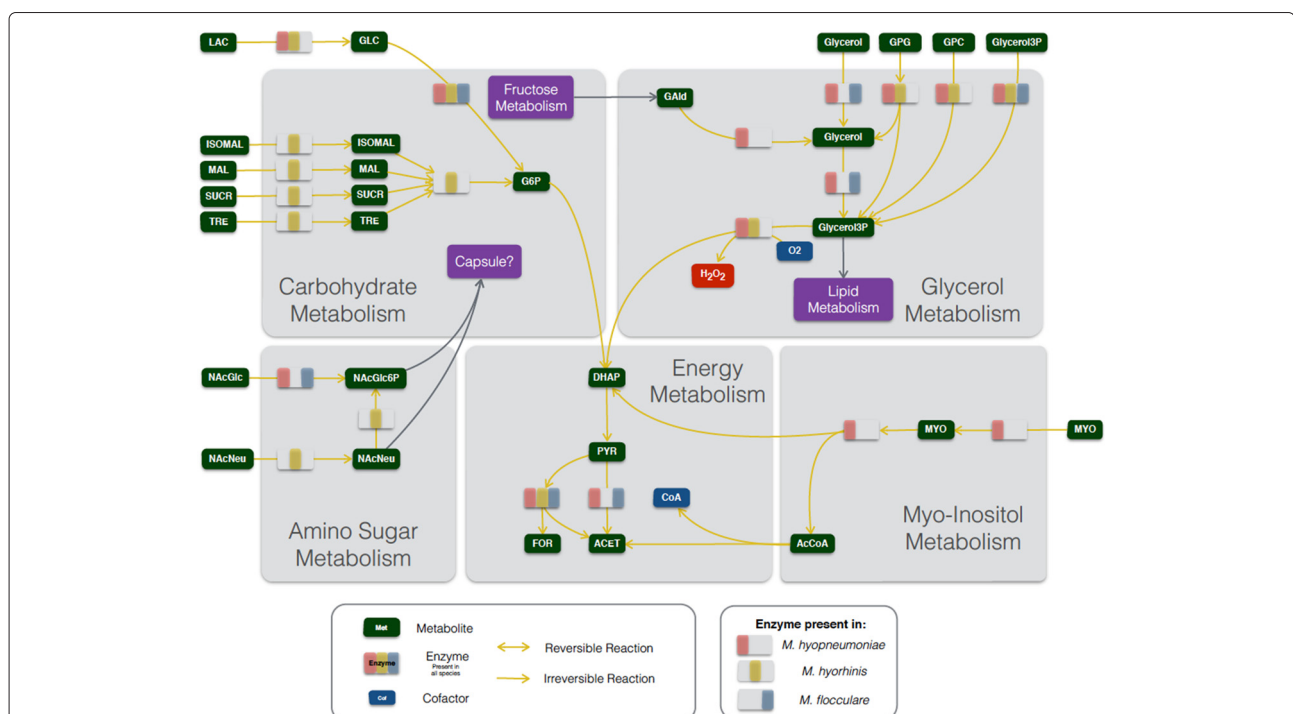


Fig. 7 Differential metabolism of *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*. Metabolites are depicted in dark green and separate enzymatic activities for *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* can be seen in yellow, pink and blue, respectively. Whenever an enzyme is missing from the three species, the enzyme rectangle is depicted in grey. Complete list of metabolite abbreviations and EC numbers can be found in Additional file 4

that myo-inositol might be directly related to the higher production of acetate in complex medium of *M. hyopneumoniae* if compared to *M. flocculare*. This assumption is based on two factors: first, a previous work has detected myo-inositol in swine serum, which is a component of the complex medium [80]; and second, the only difference in the networks that could influence the acetate concentration is the myo-inositol catabolism. This pathway may also be involved with an alternative production of AcCoA, precursor to CoA, an essential cofactor for growth in all species. These metabolic distinctions may help *M. hyopneumoniae* to grow in diverse sites if compared to *M. flocculare*. This is particularly interesting when we take a close look into the composition of lung surfactant from several mammalian models [91], which likely contains myo-inositol as a degradation product from phosphatidylinositol. Thus, it is possible that the myo-inositol catabolism in *M. hyopneumoniae* is one of the reasons for the high virulence of this species when compared to *M. flocculare* and *M. hyorhinis*.

A striking result from the NMR results was the reduced capability of *M. hyorhinis* to produce acetate. This was not foreseen in the model reconstruction, but predicted protein sequences from the pyruvate dehydrogenase complex of the three species showed a particular distinction in PdhC, more specifically in the region responsible for binding to other complex components. We could not verify at this point if this complex is not active in the particular growth conditions of our work in *M. hyorhinis* or if it is responsible for another unforeseen activity. However, a transcriptome profiling of *M. hyorhinis* has detected both *pdhA* and *pdhB* in the pool of genes with the highest number of transcript reads [32], indicating that the complex might be translated *in vivo*. Moreover, pyruvate dehydrogenase activity has been previously detected in *M. hyorhinis* extracts [75], and it seems to be correlated to oxygen availability. In our cultivations, the cells are not grown in a complete aerobic system, which may explain the differences between our findings and those previously published.

Cultivation tests *in vitro* also showed that none of the species was able to grow in none of the defined media. This is probably due to a lack of the correct cofactors as previously mentioned. For instance, thiamine, pyridoxal/pyridoxine, pantothenate, spermine and folate were the actual media components tested, but the reconstructed models were not able to convert them to biomass precursors (thiamine pyrophosphate, pyridoxal-5-phosphate, 4-phospho-pantetheine, spermidine and THF). Only *M. hyorhinis* seems to be able to uptake folate directly while the other two species might need intermediate metabolites. This might also explain why *M. hyorhinis* is extensively found as a cell culture contaminant. Even though we supplemented CMRL-1066

(CMRL+) with all missing components present in the Yus+ medium, cells maintained viability for longer periods in the latter. Cofactors present originally in both media existed in lower concentrations in the CMRL-1066. This means that possibly one or more cofactors with higher concentrations in the Yus+ medium are essential for the viability of the three species. Common cofactors with higher concentration in Yus+ medium included: choline, folate, pantothenate, pyridoxal, thiamine and spermine.

Other differences among the species seem to indicate that *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* lack one or more amino acid transporters. This may be due to two things: (i) both remained viable for longer periods whenever CMRL+ was supplemented with peptone, and (ii) we detected a higher amino acid accumulation in the defined media if compared to *M. hyorhinis*. *M. hyorhinis* on the other hand may have all the transporters for single amino acids, but this hypothesis needs to be further verified. From sequence analyses, we did not find significant differences among the species that would explain this distinct behavior. Moreover, since *M. hyorhinis* seemed to overgrow in the first 24 h of culture in both CMRL media (CMRL+ and CMRL+/Pep), it is possible that one or more compounds were missing in the Yus+ medium in order to allow growth of this species. Possible candidates for such (present in CMRL-1066 and absent in the Yus+ medium) would be: CoA, nicotinamide, ascorbate and/or pyridoxine.

It is still not clear if any of the swine mycoplasmas studied here indeed have a polysaccharide capsule, given that only one study has assessed its presence in *M. hyopneumoniae*. However, this is particularly important because in this study Tajima and Yagihashi [28], as discussed before, reported that capsular polysaccharides from *M. hyopneumoniae* play a key role in the interaction between pathogen and host. Moreover, it has been reported that some strains of *M. hyopneumoniae* become less pathogenic in broth culture and, after serial passages, lose their ability to produce gross pneumonia in pigs [26]. In several bacterial species, it has been established that the amount of capsular polysaccharide is a major factor in virulence [92] and it decreases significantly with *in vitro* passages [93]. Furthermore, despite increasing evidence supporting the existence of a polysaccharide capsule in several *Mycoplasma* species, it is not yet known if the material is synthesized by the bacteria or imported from the medium for most species [94]. Recent reports have even shown the capacity of species from the mycoides cluster to assemble a capsule from exogenous phosphorylated glucose [79, 95]. However, no homolog proteins related to these activities were found in none of the species studied in this work. For the reasons discussed above, we were not able to introduce the capsule production itself in the models; however, we tried to relate its possible

existence with the substrates that might be used to produce it. The composition of capsular polysaccharides has been related to the level of pathogenicity in other bacteria. For instance, highly virulent *Escherichia coli* strains seem to have practically nonimmunogenic capsular material, due to the fact that these antigens are similar or identical to the ones found in the host [96]. The structure of the K5 antigen from *E. coli* capsules is basically GlcNAc and glucuronic acid (GlcA) in a molar ratio of 1:1 [97]. Erlinger and collaborators [98] identified heparan sulfate (HS) as the predominant glycosaminoglycan in the porcine respiratory tract and the most common disaccharide unit within HS is GlcNAc linked to GlcA. Since *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* might be able to import GlcNAc unchanged, they may use it for the composition of its capsule; *M. hyorhinis*, on the other hand, imports sialic acid, and might use it directly to produce its own. Of course this is highly speculative, and we are not sure if all these hypotheses indeed happen in vivo.

The metabolism of glycerol is the final major difference between the pathogenic *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* and the non-pathogenic *M. flocculare*. Such metabolism and the production of hydrogen peroxide by the action of GlpO are essential for the cytotoxicity of *M. pneumoniae* [35] and *M. mycoides* subsp. *mycoides* [36]. Particularly, the cytotoxicity of *M. mycoides* subsp. *mycoides* is due to the translocation of the hydrogen peroxide into the host cells. This is only possible because of the close proximity to the host cells along with the membrane-bound enzyme. Highly conserved homolog genes to this enzyme were only found in the genomes of the pathogenic species studied here. Whether or not these enzymes from *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* are indeed capable of the same activities as GlpO is not yet confirmed; however, the high similarity may be an indication that this trait is essential for the pathogenicity of these two species. This may also explain why both *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* can adhere to the cilia of tracheal epithelial cells, but only the adhesion of *M. hyopneumoniae* results in tissue damage [33]. Moreover, while *M. hyorhinis* has in the reconstructed models three ways of uptaking glycerol, *M. hyopneumoniae* seems to have five, and this may reflect in its enhanced pathogenicity.

Conclusions

We presented in this work an overview of the differential metabolism of *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* using different approaches. The reconstructed models showed some distinctions among the species, namely the myo-inositol metabolism for *M. hyopneumoniae*, the wider uptake of carbohydrates for *M. hyorhinis* and the usage of glycerol as a carbon source for the two pathogenic species. The models also served as a basis for all the assumptions made for the experimental

data. Metabolic profiling of both complex and defined media pointed to new differences that we were not able to identify based solely on the sequenced genomes. The major ones were related to the pyruvate conversion to acetate, which appeared to be higher in *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare* than in *M. hyorhinis*. After we performed growth tests using defined media that hypothetically would lead to bacterial growth *in silico*, we assessed that some cofactors or metabolites were probably being delivered in the wrong form to the mycoplasmas. The environmental context may explain the differences between the *in silico* models and the *in vivo* behavior.

Whether the main differences among the species we reported here (summarized in Additional file 1: Table S8) are related to virulence or pathogenicity have not yet been addressed experimentally, but it is tempting to speculate. The same factors that may enhance virulence of *M. hyopneumoniae* may help the commensal species *M. flocculare* to better survive inside the host.

All these *in silico* and *in vivo* metabolic differences among *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* might influence the different levels of pathogenicity in each of them. However, it is highly likely that gene regulation may directly interfere in the metabolism and pathogenicity and may be related to many other aspects still unaccounted for. One of our future goals is therefore to understand and integrate gene regulation into the metabolic models. Upcoming experiments will aim at testing the hypotheses formulated here, particularly those related to the metabolisms of glycerol and myo-inositol. We also intend to better understand the habitat of these species, and the possible metabolic and genetic dialogues with the host and other bacteria present in this environment. Either way, this work serves as a basis for the study of the differential metabolism and pathologies caused by the swine lung mycoplasmas and may help to propose ways to prevent disease development in the future.

Availability of data and material

All models from this work are available in Additional file 5 and online at the MetExplore database (<http://metexplore.toulouse.inra.fr/metexplore2/>).

Additional files

Additional file 1: Supplementary Tables. **Table S1.** Defined media composition used for the cultivation of *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*. **Table S2.** Complete list of reactions and metabolites from all models. **Table S3.** List of all metabolites included in the final biomass composition. **Table S4.** Distribution of GPR associations and exclusive GPR associations by metabolic pathways. **Table S5.** Proposition of correct precursors and cofactors for a new defined medium. **Table S6.** NMR metabolomics: Metabolites detected in the complex Friis and Yus+ media for the three swine mycoplasmas. **Table S7.** Prediction of essential reactions in the pan-network. **Table S8.** Differential metabolism overview. (XLSX 297 kb)

Additional file 2: Biomass reaction assembly from reconstructed models. Pdf file containing all steps necessary to the assembly of the biomass reaction for all species. (PDF 906 kb)

Additional file 3: Abbreviation of metabolites and EC numbers from Figs. 3, 4 and 7. Spreadsheet containing the lists of all abbreviations and EC numbers used in Figs. 3 and 4 separately. (XLSX 22kb)

Additional file 4: Prediction of transporters. Pdf file containing all assumptions for the *in silico* prediction of transporters. (PDF 789 kb)

Additional file 5: Models in SBML format. Compressed file (.zip) containing all SBML models from this work (.sbml). (ZIP 407 kb)

Abbreviations

ATP-binding cassette; ACP: Acyl-carrier protein; BLASTp: blast local alignment search tool (protein); DEM: dead-end metabolite; CCU: color changing unit; CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill; EC number: enzyme-code number; FBA: flux balance analysis; FID: free induction decay; GAM: growth associated maintenance; GO: gene ontology; GPR: gene-protein-reaction association; HCA: hierarchical clustering analysis; HSQC spectroscopy: heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy; MIF: major facilitator protein; MW: molecular weight; NGAM: non-growth associated maintenance; NMR: nuclear magnetic resonance; NOESY: nuclear overhauser effect spectroscopy; PCA: principal component analysis; Pfam database: protein-families database; PTS: phospho-transferase transport system; SBML: systems biology markup language; TMSP: trimethylsilylpropionate; TOCSY: Total-quantum correlation spectroscopy; TU: transcriptional unit.

Enzyme abbreviations: ABC-Gly: ABC-glycerol transport system; GlyF: glycerol facilitator protein; GlpO: glycerol-3-phosphate; GlpU: glycerophosphodiester transporter; Fba: fructose-biphosphate-aldolase; loJ: 5-Dehydro-2-deoxy-phosphogluconate aldolase; Ldh: lactate dehydrogenase; Mdh: malate dehydrogenase; Pdh A/B/C/D: pyruvate dehydrogenase complex subunit A/B/C/D; UlaG: L-Ascorbate-6-phosphate lactonase.

Metabolite abbreviations used in the text (the complete list of metabolites may be found in Additional file 4): 2KG: 2-Oxoglutarate; AcCoA: Acetyl-coenzyme-A; CoA: coenzyme-A; DHA: dihydroxyacetone; DHAP: dihydroxyacetone-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; GlcNAc: N-acetyl-glucosamine; NAD/NADH: nicotinamide adenine dinucleotide; NADP/NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; MeTHF: 5,10-methylene-tetrahydrofolate; SucCoA: succinyl-coenzyme-A.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MFS and AZ conceived and designed the work in close collaboration with all the other authors. MGF performed all computational metabolic reconstructions and most of the experimental work. FMS, SGM, TLP and EJ collaborated in the experimental work. TLP performed the metabolomics statistic analysis. BEH, FT, ATRV and ISS collaborated analyzing all data. MGF, MFS and AZ wrote the manuscript with inputs from all the other authors. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants CAPES-COFECUB 782/13. MGF's doctoral fellowship was funded by the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme (FP7 /2007-2013)/ERC grant agreement no. [247073]10. SGM was the recipient of a CAPES doctoral fellowship. The metabolomic analysis was carried out in the Centre de RMN à Très Hauts Champs (CRMN-ISA-Lyon) with financial support from the TGIR-RMN-THC FR3050 CNRS.

Author details

¹ERABLE, Inria, 43, Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France. ²Cbiot, UFRGS, Av Bento Goncalves, 9500 Porto Alegre, Brazil. ³Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques (CNRS, ENS Lyon, Université Lyon 1), 5, Rue de la Doua, Villeurbanne, France. ⁴Laboratório Nacional de Computação Científica, Av. Getúlio Vargas, 333, Petrópolis, Brazil. ⁵Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, 31, Av Tony Garnier, Lyon, France. ⁶Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université de Lyon, 43, Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France. ⁷Université de Lyon, Centre Léon

Béard, Département d'oncologie médicale, 28, rue Laënnec, Lyon, France. ⁸Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, 1 Avenue Bourgelat, Marcy L'Étoile, France. ⁹Current address: LISBP – INSA Toulouse, Toulouse, France.

Received: 9 February 2016 Accepted: 22 April 2016

Published online: 13 May 2016

References

- Mare CJ, Switzer WP. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin.* 1965;60:841–6.
- Meyling A, Friis NF. Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*. *Acta Vet Scand.* 1972;13(2):287–9.
- Rose DL, Tully JG, Wittler RG. Taxonomy of some swine mycoplasmas: *Mycoplasma suis pneumoniae* goodwin et al. 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* mare and switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* meyling and friis 1972. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1979;29(2):83–91.
- Ciprian A, Pijoan C, Cruz T, Camacho J, Tortora J, Colmenares G, Lopez-Revilla R, de la Garza M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res.* 1988;52(4):434–8.
- Fano E, Pijoan C, Dee S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J Vet Res.* 2005;69(3):223–8.
- Pieters M, Fano E, Pijoan C, Dee S. An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *Can J Vet Res.* 2010;74(2): 157–60.
- Kobisch M, Friis NF. Swine mycoplasmoses. *Rev - Off Int Epizoot.* 1996;15(4):1569–605.
- Maes D, Verdonck M, Deluyker H, de Kruif A. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q.* 1996;18(3):104–9.
- Friis NF. Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of danish pigs. *Acta Vet Scand.* 1971;12:69–79.
- Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7): 2525–30.
- Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J.* 2003;44(9):735–7.
- Sorenson V, Jorsal SE, Mousing J. Diseases of the respiratory system in: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine.* Oxford: Wiley; 2013. p. 149–79.
- Minion FC, Lefkowitz EJ, Madsen ML, Cleary BJ, Swartzell SM, Mahairas GG. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol.* 2004;186(21): 7123–33.
- Vasconcelos AT, Ferreira HB, Bizarro CV, Bonatto SL, Carvalho MO, Pinto PM, Almeida DF, Almeida LG, Almeida R, Alves-Filho L, Assuncao EN, Azevedo VA, Bogo MR, Brigido MM, Brocchi M, Burity HA, Camargo AA, Camargo SS, Carepo MS, Carraro DM, de Mattos Cascardo JC, Castro LA, Cavalcanti G, Chemale G, Collevatti RG, Cunha CW, Dallagiovanna B, Dambros BP, Dellagostin OA, Falcao C, Fantinatti-Garboggini F, Felipe MS, Fiorentin L, Franco GR, Freitas NS, Frias D, Grangeiro TB, Grisard EC, Guimaraes CT, Hungria M, Jardim SN, Krieger MA, Laurino JP, Lima LF, Lopes MI, Loreto EL, Madeira HM, Manfio GP, Maranhao AQ, Martinkovics CT, Medeiros SR, Moreira MA, Neiva M, Ramalho-Neto CE, Nicolas MF, Oliveira SC, Paixao RF, Pedrosa FO, Pena SD, Pereira M, Pereira-Ferrari L, Piffer I, Pinto LS, Potrich DP, Salim AC, Santos FR, Schmitt R, Schneider MP, Schrank A, Schrank IS, Schuck AF, Seuanez HN, Silva DW, Silva R, Silva SC, Soares CM, Souza KR, Souza RC, Staats CC, Steffens MB, Teixeira SM, Urmenyi TP, Vainstein MH, Zuccherato LW, Simpson AJ, Zaha A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol.* 2005;187(16):5568–77.
- Liu W, Fang L, Li S, Li Q, Zhou Z, Feng Z, Luo R, Shao G, Wang L, Chen H, Xiao S. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain HUB-1. *J Bacteriol.* 2010;192(21):5844–5.

16. Liu W, Feng Z, Fang L, Zhou Z, Li Q, Li S, Luo R, Wang L, Chen H, Shao G, Xiao S. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J Bacteriol.* 2011;193(4):1016–7.
17. Calcutt MJ, Foeccking MF, Rosales RS, Ellis RJ, Nicholas RA. Genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain GDL-1. *J Bacteriol.* 2012;194(7):1848.
18. Siqueira FM, Thompson CE, Virginio VG, Gonchoroski T, Reolon L, Almeida LG, da Fonseca MM, de Souza R, Prosdocimi F, Schrank IS, Ferreira HB, de Vasconcelos AT, Zaha A. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC Genomics.* 2013;14:175.
19. Liu W, Xiao S, Li M, Guo S, Li S, Luo R, Feng Z, Li B, Zhou Z, Shao G, Chen H, Fang L. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics.* 2013;14:80.
20. Goodison S, Urquidi V, Kumar D, Reyes L, Rosser CJ. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma hyorhinis* Strain SK76. *Genome Announc.* 2013;1(1):e00101–12.
21. Calcutt MJ, Foeccking MF, Heidari MB, McIntosh MA. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma flocculare* Strain Ms42T (ATCC 27399T). *Genome Announc.* 2015;3(2):e00124–15.
22. Stemke GW, Laigret F, Grau O, Bove JM. Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42(2):220–5.
23. Citti C, Kim MF, Wise KS. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun.* 1997;65(5):1773–85.
24. Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, Wilton J, Minion FC. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun.* 2004;72(5):2791–802.
25. Seymour LM, Jenkins C, Deutscher AT, Raymond BB, Padula MP, Tacchi JL, Bogema DR, Eamens GJ, Woolley LK, Dixon NE, Walker MJ, Djordjevic SP. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol.* 2012;14(1):81–94.
26. Whittlestone P. Porcine mycoplasmas In: Tully J, editor. *The Mycoplasmas V2: Human and Animal Mycoplasmas.* Amsterdam: Elsevier Science; 2012. p. 134–76.
27. Xiong Q, Wang J, Ji Y, Ni B, Zhang B, Ma Q, Wei Y, Xiao S, Feng Z, Liu M, Shao G. The functions of the variable lipoprotein family of mycoplasma hyorhinis in adherence to host cells. *Vet Microbiol.* 2016;186:82–9.
28. Tajima M, Yagihashi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun.* 1982;37(3):1162–9.
29. Denny FW, Taylor-Robinson D, Allison AC. The role of thymus-dependent immunity in *Mycoplasma pulmonis* infections of mice. *J Med Microbiol.* 1972;5(3):327–36.
30. Taylor G, Taylor-Robinson D, Fernald GW. Reduction in the severity of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia in hamsters by immunosuppressive treatment with antithymocyte sera. *J Med Microbiol.* 1974;7(3):343–8.
31. Tajima M, Yagihashi T, Nunoya T, Takeuchi A, Ohashi F. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. *Am J Vet Res.* 1984;45(10):1928–32.
32. Siqueira FM, Gerber AL, Guedes RLM, Almeida LG, Schrank IS, Vasconcelos ATR, Zaha A. Unravelling the transcriptome profile of the swine respiratory tract mycoplasmas. *PLoS ONE.* 2014;9(10):110327.
33. Young TF, Thacker EL, Erickson BZ, Ross RF. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Vet Microbiol.* 2000;71(3–4):269–79.
34. Andersson SGE, Kurland CG. Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* 1998;6(7):263–8.
35. Hames C, Halbedel S, Hoppert M, Frey J, Stulke J. Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2009;191(3):747–53.
36. Vilei EM, Frey J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC: its impact on H(2)O(2) production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(1):85–92.
37. Gulig PA, Doyle TJ. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun.* 1993;61(2):504–11.
38. Paisley D, Robson GD, Denning DW. Correlation between in vitro growth rate and in vivo virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2005;43(5):397–401.
39. Amarsaikhan N, O'Dea EM, Tsoggerel A, Owegi H, Gillenwater J, Templeton SP. Isolate-dependent growth, virulence, and cell wall composition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE.* 2014;9(6):100430.
40. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of *Mycoplasma* contamination in cell culture. *Cell J.* 2012;13(4):203–12.
41. Karp PD, Paley S, Romero P. The Pathway Tools software. *Bioinformatics.* 2002;18 Suppl 1:225–32.
42. Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang HY, Cohoon M, de Crecy-Lagard V, Diaz N, Disz T, Edwards R, Fonstein M, Frank ED, Gerdes S, Glass EM, Goessmann A, Hanson A, Iwata-Reuyl D, Jensen R, Jamshidi N, Krause L, Kubal M, Larsen N, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Neuweger H, Olsen G, Olson R, Osterman A, Portnoy V, Pusch GD, Rodionov DA, Ruckert C, Steiner J, Stevens R, Thiele I, Vassieva O, Ye Y, Zagnitko O, Vonstein V. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(17):5691–702.
43. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):138–41.
44. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403–10.
45. Thiele I, Palsson BO. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc.* 2010;5(1):93–121.
46. Wodke JA, Puchalka J, Lluch-Senar M, Marcos J, Yus E, Godinho M, Gutierrez-Gallego R, dos Santos VA, Serrano L, Klipp E, Maier T. Dissecting the energy metabolism in *Mycoplasma pneumoniae* through genome-scale metabolic modeling. *Mol Syst Biol.* 2013;9:653.
47. Suthers PF, Zomorodi A, Maranas CD. Genome-scale gene/reaction essentiality and synthetic lethality analysis. *Mol Syst Biol.* 2009;5(301):301. doi:10.1038/msb.2009.56.
48. Yus E, Maier T, Michalodimitrakis K, van Noort V, Yamada T, Chen WH, Wodke JA, Guell M, Martinez S, Bourgeois R, Kuhner S, Raineri E, Letunic I, Kalinina OV, Rode M, Herrmann R, Gutierrez-Gallego R, Russell RB, Gavin AC, Bork P, Serrano L. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science.* 2009;326(5957):1263–8.
49. Noor E, Bar-Even A, Flamholz A, Lubling Y, Davidi D, Milo R. An integrated open framework for thermodynamics of reactions that combines accuracy and coverage. *Bioinformatics.* 2012;28(15):2037–44.
50. Noor E, Haraldsdottir HS, Milo R, Fleming RMT. Consistent estimation of gibbs energy using component contributions. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(7):1003098.
51. Jankowski MD, Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophys J.* 2008;95(3):1487–99.
52. *EQuilibrator 2.0.* <http://equilibrator.weizmann.ac.il/download>, Accessed 2015-08-01.
53. Flamholz A, Noor E, Bar-Even A, Milo R. *equilibrator* the biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):770–5.
54. Lee TJ, Paulsen I, Karp P. Annotation-based inference of transporter function. 2008;24(13):259–67.
55. Razin S, Argaman M, Avigan J. Chemical composition of *Mycoplasma* cells and membranes. *J Gen Microbiol.* 1963;33:477–87.
56. Chen J, Zhang L, Song J, Hwang F, Dong Q, Liu J, Qian Y. Comparative analysis of glycoprotein and glycolipid composition of virulent and avirulent strain membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Curr Microbiol.* 1992;24(4):189–92. doi:10.1007/BF01579280.
57. Smith P. Membrane lipid and polysaccharide structures. In: Maniloff J, editor. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.* Washington: American Society for Microbiology; 1992.
58. Kornspan JD, Rottem S. The phospholipid profile of mycoplasmas. *J Lipids.* 2012;2012:640762.
59. Feist AM, Henry CS, Reed JL, Krummenacker M, Joyce AR, Karp PD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V, Palsson BO. A genome-scale metabolic

- reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol Syst Biol.* 2007;3:121.
60. Neidhardt FC, Vol. v. 1. *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Washington: American Society for Microbiology; 1987.
 61. Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, Kitano H, Arkin AP, Bornstein BJ, Bray D, Cornish-Bowden A, Cuellar AA, Dronov S, Gilles ED, Ginkel M, Gor V, Goryanin II, Hedley WJ, Hodgman TC, Hofmeyr JH, Hunter PJ, Juty NS, Kasberger JL, Kremling A, Kummer U, Le Novère N, Loew LM, Lucio D, Mendes P, Minch E, Mjolsness ED, Nakayama Y, Nelson MR, Nielsen PF, Sakurada T, Schaff JC, Shapiro BE, Shimizu TS, Spence HD, Stelling J, Takahashi K, Tomita M, Wagner J, Wang J. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics.* 2003;19(4):524–31.
 62. Schellenberger J, Que R, Fleming RM, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmian S, Kang J, Hyduke DR, Palsson BO. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc.* 2011;6(9):1290–307.
 63. Friis NF. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med.* 1975;27(6):337–9.
 64. Stemke GW, Robertson JA. The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* based upon ATP-dependent luminometry. *Vet Microbiol.* 1990;24(2):135–42.
 65. Poveda JB. Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *Methods Mol Biol.* 1998;104:69–78.
 66. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):801–7.
 67. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):61–4.
 68. Lee N. Characterization of an ATP-binding cassette (ABC) transport system involved in nucleoside uptake in *Mycoplasma bovis* strain M23, and discovery of its pathogenicity genes. Iowa State University. 20091–133. TransportDB. <http://www.membranetransport.org/>, Accessed 2015-04-30.
 69. Grosshennig S, Schmid SR, Schmeisky G, Busse J, Stulke J. Implication of glycerol and phospholipid transporters in *Mycoplasma pneumoniae* growth and virulence. *Infect Immun.* 2013;81(3):896–904.
 70. Schmid SR, Otto A, Lluch-Senar M, Pinol J, Busse J, Becher D, Stalke J. A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: Impact of the glycerophosphodiesterase glpq on virulence and gene expression. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):1002263. doi:10.1371/journal.ppat.1002263.
 71. Araes FBM, de Carvalho MJA, Maranhão AQ, Brígido MM, Pedrosa FO, Felipe MSS. Differential metabolism of *Mycoplasma* species as revealed by their genomes. *Genet Mol Biol.* 2007;30:182–9.
 72. Bourand A, Yebra MJ, Boel G, Maze A, Deutscher J. Utilization of D-ribose by *Lactobacillus casei* BL23 requires a mannose-type phosphotransferase system and three catabolic enzymes. *J Bacteriol.* 2013;195(11):2652–61.
 73. Manolukas JT, Barile MF, Chandler DK, Pollack JD. Presence of anaplerotic reactions and transamination, and the absence of the tricarboxylic acid cycle in mollicutes. *J Gen Microbiol.* 1988;134(3):791–800.
 74. Constantopoulos G, McGarrity GJ. Activities of oxidative enzymes in mycoplasmas. *J Bacteriol.* 1987;169(5):2012–6.
 75. Tourtellotte ME, Jacobs RE. Physiological and serologic comparisons of PLO from various sources. *Ann N Y Acad Sci.* 1960;79:521–30.
 76. Cordwell SJ, Basseal DJ, Pollack JD, Humphery-Smith I. Malate/lactate dehydrogenase in mollicutes: evidence for a multienzyme protein. *Gene.* 1997;195(2):113–20.
 77. Wieslander A, Rosen M. The cell membrane and transport. In: Razin S, Herrmann R, editors. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Dordrecht: Kluwer Academic/Plenum; 2002.
 78. Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silvan L, Thiaucourt F, Tardy F, Le Grand D, Poumarat F, Gaurivaud P. Characterization of free exopolysaccharides secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *PLoS ONE.* 2013;8(7):68373. doi:10.1371/journal.pone.0068373.
 79. He Q, Ren P, Kong X, Wu Y, Wu G, Li P, Hao F, Tang H, Blachier F, Yin Y. Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabolomic approach. *J Nutr Biochem.* 2012;23(2):133–9.
 80. Glass JI, Assad-García N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(2):425–30. doi:10.1073/pnas.0510013103.
 81. Hutchison CA, Peterson SN, Gill SR, Cline RT, White O, Fraser CM, Smith HO, Venter JC. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science.* 1999;286(5447):2165–9.
 82. Devos D, Valencia A. Intrinsic errors in genome annotation. *Trends Genet.* 2001;17(8):429–31.
 83. Green ML, Karp PD. Genome annotation errors in pathway databases due to semantic ambiguity in partial EC numbers. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(13):4035–9.
 84. Drexler HG, Uphoff CC. *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 2002;39(2):75–90.
 85. Huang S, Li JY, Wu J, Meng L, Shou CC. *Mycoplasma* infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol.* 2001;7(2):266–9.
 86. Friis NF. *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* in comparative pathogenicity studies. *Acta Vet Scand.* 1974;15(4):507–18.
 87. Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol.* 2007;120(1–2):96–104.
 88. Reynolds TB. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *Microbiol (Reading, Engl.)* 2009;155(Pt 5):1386–96.
 89. Brown DR, Demcovitz DL, Plourde DR, Potter SM, Hunt ME, Jones RD, Rotstein DS. *Mycoplasma iguanae* sp. nov., from a green iguana (*Iguana iguana*) with vertebral disease. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(Pt 4):761–4.
 90. Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1408(2–3):90–108.
 91. Corbett D, Roberts IS. The role of microbial polysaccharides in host-pathogen interaction. *F1000 Biol Rep.* 2009;1:30.
 92. Kasper DL, Weintraub A, Lindberg AA, Lonngren J. Capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from two *Bacteroides fragilis* reference strains: chemical and immunochemical characterization. *J Bacteriol.* 1983;153(2):991–7.
 93. James M, Daubenspeck DSJ, Dybvig K. The glycocalyx of mollicutes. In: Browning GF, Citti C, editors. *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. Dorset: Caister Academic Press.
 94. Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silvan L, Tardy F, Poumarat F, Citti C, Sirand-Pugnet P, Gaurivaud P, Thiaucourt F. Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(2):676–87.
 95. Boulnois GJ, Jann K. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Mol Microbiol.* 1989;3(12):1819–23.
 96. Vann WF, Schmidt MA, Jann B, Jann K. The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* O10:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. *Eur J Biochem.* 1981;116(2):359–64.
 97. Erlinger R. Glycosaminoglycans in porcine lung: an ultrastructural study using cupromeronic blue. *Cell Tissue Res.* 1995;281(3):473–83.

10. CURRICULUM VITAE

MUCHA, S. G.

1. DADOS PESSOAIS

Nome:

Scheila Gabriele Mucha
scheila.mucha@gmail.com

Local e data de nascimento:

17/09/1989 – Santa Rosa, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço profissional:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.
Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421 - Setor IV - Campus do Vale
Agronomia
91591970 - Porto Alegre, RS – Brasil
Telefone: (51) 3308 6077

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

- 2013 – atual** Doutorado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 7).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
com **período sanduíche** em Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, França
Título: Aspectos da virulência e da relação entre *Mycoplasma hyopneumoniae* e seu hospedeiro
Orientador: Arnaldo Zaha
Co-orientadora: Marie-France Sagot
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2013** Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 7).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Análise da expressão de fatores de transcrição recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Ano de obtenção: 2013
Orientador: Irene Silveira Schrank
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2007 - 2010** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Desenvolvimento de Vetores para Transformação em *Mycoplasma*

hyopneumoniae.

Orientador: Irene Silveira Schrank

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

3. ESTÁGIOS

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

- 2013 – atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutoranda, Regime: Dedicção exclusiva
- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda, Regime: Dedicção exclusiva
- 2009 - 2010** Vínculo: Bolsista Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
- 2008 - 2009** Vínculo: Aluna de Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

- 2014 – atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia, UFRGS
Linhas de pesquisa:
Abordagem multidisciplinar no estudo da biodiversidade, interação e metabolismo bacteriano em suínos
- 2011 - atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia, UFRGS
Linhas de pesquisa:
Caracterização de proteínas regulatórias de Mycoplasma hyopneumoniae
- 2008 –2010** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia, UFRGS
Linhas de pesquisa:
Vetores de transformação de Mycoplasma hyopneumoniae

2. Laboratório Nacional Agropecuário RS - LANAGRO/RS

Vínculo institucional

- 2010 - 2010** Vínculo: Bolsista ITI, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

- 08/2010 - 12/2010** Estágio, LABV - Laboratório de Bebidas e Vinagres
Estágio supervisionado: 700h
Estágio: Análises físico-químicas de bebidas

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

FERRARINI, F.M.; MUCHA, S. G.; PARROT, D.; MEIFFREIN, G.; BACHEGA, J. F. R.; COMPTE, G.; ZAHA, A. & SAGOT, M. F. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol Microbiol., 108(6): 683-696, 2018.

FERRARINI, M. G.; SIQUEIRA, F. M.; MUCHA, S. G.; PALAMA, T. L.; JOBARD, E.; ELENA-HERRMANN, B; VASCONCELOS, A. T. R.; TARDY, F.; SCHRANK, I. S.; ZAHA, A. & SAGOT, M.-F. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. BMC Genomics, 17: 353, 2016.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. MUCHA, S. G., SCHRANK, I. S.

Cloning and expression of recombinant transcription regulators of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 7448 In: 28ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2012, Foz do Iguaçu.

Resumos da 28ª Reunião de Genética de Microrganismos. , 2012.

2. MUCHA, S. G., SCHRANK, I. S.

Desenvolvimento de Vetores para Transformação em *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2010, Porto Alegre.

Livro de Resumos - XXII Salão de Iniciação Científica e XIX Feira de Iniciação Científica UFRGS. , 2010.

3. MUCHA, S. G., REOLON, L. A., SCHRANK, I. S.

Desenvolvimento de um vetor para análise de regiões promotoras em *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2009, Porto Alegre.

Livro de Resumos - XXI Salão de Iniciação Científica e XVIII Feira de Iniciação Científica UFRGS. , 2009.